

Aus der Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt Rostock

***In-vitro* Untersuchungen zur Biokompatibilität von
polymeren Netzstrukturen insbesondere zur
Anwendung in der Urogynäkologie**

Habilitationsschrift

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitata (Dr. rer. nat. habil.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter,

geb. am 07.03.1956 in Rostock

Datum der Abgabe der Habilitationsschrift: 13.08.2015

Datum der Verteidigung der Habilitationsschrift: 21.03.2016

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Udo Jeschke;
Klinikum der Universität München, Frauenklinik
2. Herr Prof. Dr. Volker Briesse;
Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt
3. Herr Prof. Dr. Christoph Alexiou;
Universitätsklinikum Erlangen, Hals-Nasen-Ohren-Klinik

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
1 Einleitung	11
1.1 Biomaterialien in der Beckenbodenchirurgie	11
1.1.1 Allgemeines	11
1.1.2 Historie der Netzentwicklung	12
1.1.3 Netze in der Urogynäkologie	13
1.1.4 Alloplastische Materialien	15
1.2 Das Becken der Frau	20
1.2.1 Anatomie des weiblichen Beckenbodens	20
1.2.2 Beckenbodendefekte	23
2 Zielstellung	28
3 Material und Methoden	31
3.1 Verwendete Biomaterialien	31
3.1.1 Netze	31
Handhabung der Netze	36
Qualitative und quantitative EDX-Analyse	36

Inhaltsverzeichnis

3.2	Zellmaterialien	37
3.2.1	Zellkultur	39
3.3	Versuchsaufbau	43
3.3.1	Testverfahren	45
	pH-Wert-Analyse	45
	Glukosebestimmung	45
	Oxidativer Stress	46
	Immunhistochemie	47
	Zellproliferation, mitochondriale Vitalität und Zytotoxizität . .	50
	Morphologische Verlaufsanalysen	63
	Bestimmung von physiologischen und pharmakodynamischen Effekten	66
	ImageJ (Bildverarbeitungsprogramm)	69
	Statistik	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Metabolische Untersuchungen	71
	Vitalitätstestungen	71
	pH-Wert-Analyse	71
	Glukosebestimmungen in den Zellkulturüberständen	73
	Auswertung des oxidativen Stresses	74
4.2	Immunhistochemie (IHC) und FACS-Analyse	75
	Immunhistochemie	75
	FACS-Analyse	79
4.3	Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität	81

Inhaltsverzeichnis

Proliferation (BrdU-Test)	81
Vitalitätsuntersuchungen mit dem MTT-Test	82
Zytotoxizitätsergebnisse mittels LDH-Test	83
4.4 Qualitative Auswertungen	84
Licht- und Rasterelektronenmikroskopie	84
Qualitative und quantitative Ergebnisse der EDX-Analysen . . .	92
4.5 Adhärenz-Quantifizierung mit ImageJ und iCycler	97
ImageJ-Auswertung	97
Molekularbiologische Ergebnisse am iCycler	99
4.5.1 Einordnung der Zwischenergebnisse	101
4.6 Physiologische und pharmakodynamische Effekte	103
4.7 Zelladhärenz der Fibroblasten	107
4.8 Biologisches Verhalten und klinische Anwendung	107
5 Diskussion	111
Literaturverzeichnis	124
Abbildungsverzeichnis	139
Tabellenverzeichnis	145
Danksagung	147
Selbstständigkeitserklärung	149
Appendix	150

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Silber (Argentum)
AK	Antikörper
AG	Antigen
Al	Aluminium
ANOVA	Varianzanalyse
bp	Basenpaare
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CD 68	Cluster of Differentiation 68
Cl ⁻	Chloridion
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSN 960 A	Herstellernummer Rasterelektronenmikroskop
EDTA	Ethylendiamintetraacid
EDX	Energy dispersive X-ray Spectroscopy
EMZ	Elektronenmikroskopiezentrum
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Abkürzungsverzeichnis

ER α	Estrogenrezeptor α
F	Fluor
FACS	Zellzyklusanalyse
FDA	US Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOD	Glukoseoxydase
°C	Grad Celsius
H	Wasserstoff
1 N HCl	1 normale Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
1 M H ₂ SO ₄	1 molare Schwefelsäure
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Inc.	Incorporated
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
KG	Kommanditgesellschaft
KIM	Klinik für Innere Medizin
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M.	Muskulus
MAK	monoklonaler Mausantikörper
μl	Mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mm	Millimeter
max.	maximal
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
N	Stickstoff
N	Newton, SI-Einheit
Na	Natrium
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NADH ₂	Nicotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
neg.	negativ
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
o. g.	oben genannt
PA	Polyamid
PBS	Phoshat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGACL	Copolyester aus Polyglykolsäure und Capolacton
POD	Peroxidase
pos.	positiv
PP	Polypropylen
prim.	primär
%	Prozent
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA-abbauende Enzyme

Abkürzungsverzeichnis

rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
R.T.U.	ready to use (gebrauchsfertig)
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	Reverse Transkriptase-Reaktion
S	Schwefel
Si	Silicium
s. o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
Ti	Titan
TiO	Titanoxid
TiO ₂	Titandioxid
TMB	Tetramethylbenzidin
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Einleitung: In der vorliegenden Habilitation stelle ich Methoden zur Rekonstruktion des Beckenbodens mit Hilfe synthetischer Netze und Bänder unter besonderer Berücksichtigung der Adhärenz von Fibroblasten vor. Fibroblasten wachsen zwischen anderen Gewebestrukturen ubiquitär im Organismus, „reparieren“ Gewebedefekte und verbinden mit unterschiedlicher Elastizität morphologische Bereiche. In einem *in-vitro* Modell wurde die Fibroblastenzellkultur zur Gewährleistung von Adhärenzen dahingehend erweitert, dass nunmehr Netze unterschiedlicher Materialien ein Wachstum von Fibroblasten innerhalb vorgegebener Strukturen ermöglichen. Der Einsatz synthetischer Netze und Bänder in der plastischen Beckenbodenchirurgie stellt nicht nur einen Stabilitätsfaktor dar, sondern ist auch mit der Vorstellung verbunden, geeignete Adhäsionsflächen für Fibroblasten zu schaffen, um die Regeneration körpereigener Strukturen zu unterstützen⁷¹.

Material/Methoden: Die Testung beinhaltete licht- und elektronenmikroskopische Verlaufsbeobachtungen zur Beurteilung der Zellmorphologie und zur Befundung des Bewuchses auf den Netzen. Die Fibroblasten wurden mit einem Fibroblastenmarker immunhistochemisch charakterisiert. Es gelang eine zeitliche Quantifizierung des Fibroblastenwachstums in das Netzmaterial durch Ermittlung der Zellzahl, durch molekularbiologische Testverfahren und durch FACS-Analysen. Neben kommerziellen Fibroblasten kamen zusätzlich humane Primärzellen (epitheliales Operationsgewebe) zum Einsatz, die vor Versuchsbeginn mit dem CD 68-Marker immunhistochemisch auf Reinheit und mit einem Fibroblastmarker charakterisiert wurden. Insgesamt standen 19 Netze zur Verfügung. Darunter befanden sich auch beschichtete Varianten (Silber/Titan). Alle Implantate wurden einer Energiedispersiven-Röntgen-Mikrobereichsanalyse unter-

zogen. Durch diese Nutzung gelang eine qualitative und quantitative Stoffbestimmung. Die additive Wirkung von Estradiol und Progesteron wurde immunhistochemisch detektiert. Das spezielle Bildverarbeitungsprogramm ImageJ stellte eine weitere Betrachtungsweise der Zelladhärenz in die Maschen dar. Zusätzlich konnten physiologische und pharmakodynamische Effekte mit Netzfäden an humanen Fibroblastzellen untersucht werden. In kurzen Zeitabständen wurde während des Kunststoffkontaktes der Metabolismus (oxidativer Stress, Glykolyse, pH-Wert) der Zellen kontrolliert. Durch Nutzung von LDH-, BrdU- und MTT-Assays gelang photometrisch die Überprüfung der IC50. Außerdem konnte das biologische Verhalten zweier Netze im Gewebe bestimmt und mit den *in-vitro* Ergebnissen verglichen werden. Durch eine Videoaufnahme gelang die Darstellung der Zelladhärenz am Netz TiLOOP® (Fa. pfm medical ag; Köln; Deutschland).

Ergebnisse: In den Materialien wurde licht- und rasterelektronenmikroskopisch das Einwachsen der Fibroblasten beobachtet. Es wurde zwischen sehr gutem, gutem und weniger gutem Bewuchs der Netze unterschieden. Die Vitalität der Zellen betrug $\geq 95\%$ und das Zellwachstum proliferierte um das 10fache während der Versuche. Alle Zelllinien waren Vimentin positiv und CD 68 negativ. Bei den kommerziellen Zellen konnten kein ER α und PR nachgewiesen werden, aber in den Primärzellen wurden die Rezeptoren visualisiert. p53 und Ki 67 zeigten mittels der IHC eine positive Reaktion. Am iCycler ergaben sich in den Netzen unterschiedliche Zelladhärenzkonzentrationen, die sich in den FACS-, licht- und rasterelektronenmikroskopischen Ergebnissen widerspiegeln. Laboruntersuchungen zum Metabolismus der Zellen wiesen keine Pathologien auf. Zu keinem Zeitpunkt lag eine IC50 vor. Die histologische Aufarbeitung der Explantate zeigte, dass das biologische Verhalten der Kunststoffe im lebenden Organismus die *in-vitro* Ergebnisse gut reflektiert.

Schlussfolgerung: Durch Anwendung dieser Resultate war es möglich, aus der Zellforschung implantatcharakterisierende Parameter abzuleiten, und diese mit der Industrie umzusetzen. Dabei entstand makroskopisch ein Netz, das durch seine textiltechnologische Konstruktion den modernsten Forschungsergebnissen entsprach. Mikroskopisch wurde das textile Implantat so physikalisch modifiziert, dass für die Körperzellen die Oberfläche wachstumsoptimiert und darüber hinaus kein Bakterienbewuchs zugelassen wurde.

1 Einleitung

1.1 Biomaterialien in der Beckenbodenchirurgie

1.1.1 Allgemeines

Die Grundlage der regenerativen Medizin ist die Nutzung von Biomaterialien. Diese Materialien können synthetischer oder natürlicher Herkunft sein. In der heutigen Zeit sind Biomaterialien aus der Medizin unabdingbar. Sie wirken direkt als Gewebeersatz im vitalen Organismus oder als Trägerstoffe für Gewebe- bzw. Zellzüchtungen. Solche degradierbaren Gerüste im Tissue Engineering zeichnen sich nicht nur durch Biokompatibilität aus, sondern sie erfüllen auch zusätzlich bestimmte Funktionen. Biokompatible Materialien beeinflussen über Oberflächenmodifikation oder Integration biologischer Signalmoleküle das Wachstumsverhalten der Zellen im Organismus. Durch eine definierte Mikro- oder Makroporosität der Materialien ist es möglich, Einfluss auf die Zelladhäsion und -proliferation zu nehmen. Gegenwärtig zählen Biomaterialien nicht nur in der Medizin zu den Forschungsschwerpunkten, sondern auch in den benachbarten naturwissenschaftlichen Gebieten. Deren Fokus liegt in erster Linie auf der Charakterisierung der zur Verfügung stehenden Stoffe. Desweiteren ist es von höchstem Anliegen, neue Synthesewege zu entwickeln, damit die erforderlichen mechanischen, chemischen

und biomedizinischen Eigenschaften in den Materialien verwirklicht werden können. Die urogynäkologischen Implantate fusionieren mit erschlafftem Gewebe und stabilisieren dieses. Dabei werden bindegewebige Strukturen und Ligamente gestützt und verstärkt^{9;27;63;95}.

1.1.2 Historie der Netzentwicklung

Schon seit 150 Jahren werden künstliche Materialien in der Viszeralchirurgie zum Verschießen von Defekten genutzt. Bereits 1831 verwendete Belmas Fischschwimmbalgen bei der Behandlung von Leistenbrüchen. Um 1900 entwickelte Witzel Silberdrahtnetze für Bauchwandhernien. Busse erwähnte 1901 die Verwendung von Goldmaterialien und Fieschi setzte 1931 Gummischwämme bei chirurgischen Eingriffen ein. In der Publikation von Olgvie (1940) wurde erstmalig die Implantation von Stoffnetzen bei Kriegsverletzungen genannt (historische Publikationen zitiert nach Schumpelick et al., 1999)^{86;94;110}. Polymere Stoffe als Gewebeersatz wurden erst nach dem 2. Weltkrieg entwickelt. Von diesem Zeitpunkt an gerieten die Radikaloperationen immer mehr in den Hintergrund und künstliche Materialien hielten Einzug in die Chirurgie. 1948 benutzten Acquaviva und Bourret erstmalig Nylon® als synthetisches Material zur Defektheilung. 1952 hat Cumberland Netze bei Hernienoperationen verwendet²⁴. 1954 kam das Polyester-Mesh Mersilene® auf den Markt, welches auch heute noch genutzt wird. Usher hat, so wird berichtet, 1959 das Marlex®-Mesh, ein Polyester-Netz, eingesetzt³⁹. Usher hat nicht nur die Nutzung von Polymeren in der Medizin beschrieben, sondern er war auch der erste, der mittels *in-vitro* und *in-vivo* Experimenten (Zell- und Tierversuche) seine praktischen Erfahrungen wissenschaftlich unterlegte¹⁰³. Dann dauerte es allerdings zweieinhalb Jahrzehnte (1986) bis Lichtenstein seine Netzümplantationen

bei Leistenhernien dokumentierte und publizierte. Zu Beginn der 90er Jahre entwickelte sich die Laparoskopie in der Hernienchirurgie, was zur Folge hatte, dass es zu einem Aufschwung beim Einsatz von Mesh-Materialien kam⁶⁴. 1990 entwickelte Schultz die transabdominale präperitoneale Prothese (TAPP). Gleichzeitig veröffentlichte Popp 1990 seine Technik mit einem intraperitonealen Mesh (IPOM)⁸⁶. 1992 wurde von Ferzli die totale extraperitoneale Prothesen-Operation (TEP) eingeführt, welche Law und McKernan 1993 optimierten²⁸. Fast täglich entstehen gegenwärtig kontroverse Publikationen zu Netzümplantationen bei Viszeraldefekten und bei Störungen am weiblichen Becken³³.

1.1.3 Netze in der Urogynäkologie

Die Urogynäkologie umfasst Methoden der regenerativen Medizin, z.B. Gewebeersatz, Gewebestabilisierung. Im Zusammenhang mit degenerativen Erkrankungen gesehen, nimmt der Beckenboden aus urogynäkologischer Sicht eine zentrale Stellung für den weiblichen Organismus ein. So ist das Lebenszeitrisko für Prolapsoperationen bis zum 8. Lebensjahrzehnt von 11 % auf 18,7 % gestiegen. Neben den Senkungsbeschwerden ist es die Harninkontinenz, die einen hohen Leidensdruck ausmacht. Petros und Ulmsten (1990, 1993) und die weiteren Veröffentlichungen von Petros (2007) zeichnen die Ursachen von Vaginalprolaps und Dysfunktionen (Belastungsharninkontinenz, Restharnbildung, Harndrangsymptomatik und Stuhlentleerungsstörungen) in der Integraltheorie auf. Dabei spielt das Bindegewebe die entscheidende Rolle. Daraus resultierende Defizite wirken sich beträchtlich auf Topographie und Funktion der Organe aus. Der Fokus bei der operativen Therapie liegt in der Wiederherstellung des normalen Stütz- und Halteapparates des Beckenbodens. Das altersbedingte Nachlassen der

Elastizität des Beckenbindegewebes, mechanische Degenerationen als Folge von z. B. Geburten oder genetisch bedingt insuffizientes Gewebe sind die maßgebenden Ursachen für Beckenbodendefekte^{8;71}. Die Operationstechnik Kolposuspension nach Burch (1968) kann das defekte Ligamentum pubourethrale nicht ersetzen. Sie bewirkt eine Fixierung des zystourethralen Übergangs und unter Umständen eine Öffnung des hinteren Kompartiments mit Entstehen einer Rectozele. Durch den Gebrauch von alloplastischen Netzmaterialien mit Ersatz des defekten Ligamentum pubourethrale wurde die konventionelle Operationsmethode nach Burch weitgehend abgelöst und stellt nun den Goldstandard in der Behandlung der Belastungsharninkontinenz dar. Ein weiterer Schritt war die Verwendung von Implantaten zum Ersatz von defekten Faszien. Beispielsweise konnte unter Verwendung der Polypropylenetze eine Stabilisierung des Deszensus erreicht werden³⁵. Die Rezidivhäufigkeit nach operativ korrigierenden Verfahren betrug bei konventionellen Kolporrhaphien bis zu 40 %. Die hohe Anzahl der auftretenden Rezidive bei den Methoden waren ausschlaggebend für die weitere Mesh-Entwicklung in der Beckenbodenrekonstruktion⁶⁰. Die ersten Netzmaterialien, die zur Beckenbodenrekonstruktion verwendet wurden, waren Herniennetze. Diese Herniennetze passte der Operateur dem jeweiligen weiblichen Beckenboden an. Sie wurden vom Operateur zugeschnitten. Erst mit der Nutzung von Polymernetzen war es möglich, die Rezidivrate zu dezimieren. Aufgrund dessen sollte jede Netzimplantation für die Beckenbodenrekonstruktion auch heute noch immer im Hinblick auf individuelle Risikofaktoren betrachtet werden. Wichtig für die Beckenbodenchirurgie sind die interdisziplinären S2e-Leitlinien „Diagnostik und Therapie der Belastungsinkontinenz der Frau“ von 2013 (AWMF-Register-Nummer: 015). In dieser Leitlinie sind Heilungserfolge und Lebensqualitätsvorteile gegenüber konventionellen Techniken aufgezeichnet.

1.1.4 Alloplastische Materialien

Definition Alloplastisches Material bedeutet soviel wie „anorganisches synthetisches oder inertes Fremdmaterial“⁵⁸.

Nach Keim und Anthuber gibt es noch keine empirisch abgesicherten Langzeitstudien über Mesh-Operationen. Zu den relevanten Kennzeichen alloplastischer Netzimplantate zählen:

1. Resorbierbarkeit

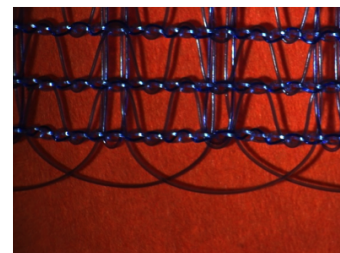
In puncto Resorbierbarkeit wird unterschieden in nicht resorbierbare, beschichtete nicht resorbierbare, teilresorbierbare und resorbierbare Netzmaterialien.

a) nicht resorbierbare Netze

Nicht resorbierbare Meshes bestehen aus Polypropylen (PP). PP wird vom Organismus nicht physiologisch abgebaut. Als Beispiel sei hier genannt das SERASIS PA-Band (Abbildung 1.1) von SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG (Naila; Deutschland), bestehend aus 100 %-igem PP.



(a) SERASIS PA-Band



(b) Netzgewirk

Abbildung 1.1: SERASIS PA-Band und das entsprechende Netzgewirk.

b) beschichtete nicht resorbierbare Netze

Das beschichtete, nicht resorbierbare Netz besteht aus zwei Komponenten,

dem nicht resorbierbaren Polymer und einem Edelmetall z.B. Titan, Silber oder Kupfer. Stellvertretend sei hier das TiLOOP® (Fa. pfm medical ag; Köln; Deutschland) genannt. Das TiLOOP® ist ein Netz aus titanisiertem PP, welches zur defektorientierten Beckenbodenrekonstruktion genutzt wird (Abbildung 1.2). Durch die Titanbeschichtung werden eventuell auftretende Kontaminationen gehemmt. Jedoch fördern die Titanlegierungen aufgrund ihrer rauen Oberflächenstruktur die Zelladhäsion.

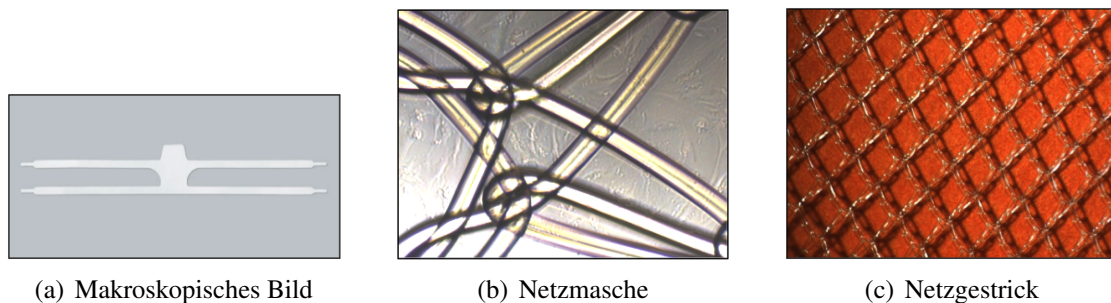
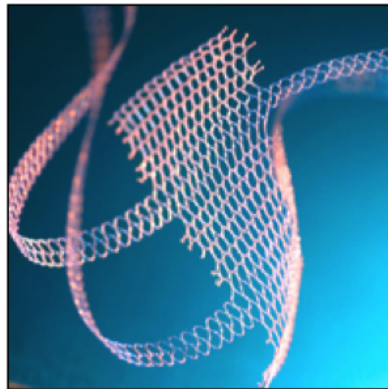


Abbildung 1.2: TiLOOP®, Fa. pfm

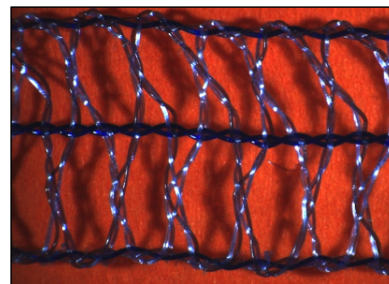
c) teilresorbierbare Netze

Gegenstand eines teilresorbierbaren Netzes ist, dass das Material aus zwei Teilen, dem nicht resorbierbaren Polymer und dem resorbierbaren, antiinflammatorischen, antiproliferativen Polyglycapronen, besteht. Als Beispiel sei hier das Netz SERATOM® PA (Fa. SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG Naila; Deutschland) erwähnt. In diesem Netz sind teilresorbierbare Bio-komponentenfäden eingewirkt. Das SERATOM® PA (Abbildung 1.3) besteht aus dem nicht resorbierbaren PP und dem resorbierbaren, segmentierten Copolyester aus Polyglykolsäure und Polycaprolacton (PGACL). Die Resorption des PGACL im Organismus dauert im Regelfall 90-120 Tage.

Während dieser Zeit erfolgt auch die Einsprossung körpereigener Zellen in die Netzmaschen. Nach der Resorption verbleibt im Körper ein stabiles, dauerhaftes, weiches und leichtes Netzgeflecht mit Einzelfilamenten. Derzeit gelten diese teilresorbierbaren Implantate als sehr vielversprechend in der Beckenbodenrekonstruktion.



(a) SERATOM PP®



(b) Netzmaschen

Abbildung 1.3: SERATOM® PP, Fa. SERAG-Wiessner & Co. KG, Naila, Deutschland

d) resorbierbare Netze

Resorbierbare Netze sind nicht nur biologische Netze, sondern können auch synthetischer Herkunft sein. Diese Netzmaterialien werden physiologisch nach ca. 180 Tagen vom Organismus abgebaut. Aus Stabilitätsgründen haben sie sich in der Urogynäkologie nicht bewährt⁴⁸(Interdisziplinäre S2e-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Belastungsinkontinenz der Frau, 2013).

2. Porengröße

Idealerweise sollte die Porengröße ≥ 1 mm sein. Eine Porengröße von 2 mm - 3 mm verhindert das „bridging“ (dichte Narbenplatte aus Netzmaterial) und „shrinking“ (das Schrumpfen des Bindegewebes von 20 %).

3. Netzdicke

Das Einwachsen des Implantats ist weitestgehend von der Netzoberfläche abhängig. Gegenwärtig werden Implantate mit Netzdicken von 0,2 mm - 2 mm angeboten⁴⁸.

4. Filamentenstruktur

Unter Filamentenstruktur wird die Struktur einer Textilfaser verstanden. Filamentenstruktur wird in der Literatur auch Fadenwerk genannt. Es wird zwischen Mono- und Multifilamenten differenziert.

a) Multifilamente

Multifilamente sind Bündel von Chemiefasern, die textiltechnologisch erzeugt werden. Sie werden als multifil bezeichnet und bestehen aus vielen Einzelfilamenten. Multifilamente zeichnen sich durch eine hohe Reißfestigkeit aus. Allerdings bilden sie in der medizinischen Anwendung häufig Infektionen aus^{16;41;87}.

b) Monofilamente

Einzelfilamente werden auch als Kapillarfäden bzw. monofil bezeichnet. Aufgrund ihrer minimalen Oberfläche ist die Entzündungsrate bei medizinischer Nutzung gering^{16;41;87}.

5. Gewicht

Das Gewicht eines medizinischen Netzes spielt eine wesentliche Rolle in der Implantationsmedizin. Insbesondere wirkt das Gewicht eines Netzes auf die Strukturintegrität. Es wird zwischen leichtgewichtigen und schwergewichtigen Netzen unterschieden (30 g/m² - 100 g/m²). Angesichts dessen, dass bei leichtgewichtigen Materialien auch wenig Fremdmaterial im Organismus verbleibt, und dem-

zufolge die Fremdkörperreaktion mindert, sind diese für die Chirurgie und Urogynäkologie günstiger^{44;69}.

6. Elastizität

Elastizität ist die Spannkraft eines Körpers. Durch das Einwirken einer mechanischen Kraft auf einen Körper, kann dieser seine Form oder Lage zunächst verändern und dann aufgrund seiner Elastizität wieder in seine Ausgangsposition oder -form zurückkehren. Die Elastizität wird bei Netzimplantaten unter Verwendung einer Kraft von 16 N geprüft^{38;48;69}.

7. Druckbelastung

Auch die Druckbelastung ist für die Netzchirurgie von Bedeutung. Die Bruchlast der Netzmaterialien liegt zwischen 250 mmHg - 500 mmHg⁴⁸.

8. Biokompatibilität

Normbiokompatibilität umfasst die Gesamtheit aller Untersuchungen zur Verträglichkeit (DIN EN ISO 10993). Vor allem ist die Biokompatibilität von Implantaten relevant, da diese sich für einen langen Zeitraum in direktem Kontakt zu einem Lebewesen befinden. Dabei spielt die Inflammationsreaktion eine große Rolle^{33;48;109}.

Fazit Demgemäß sollten textile Implantate (Netze und Bänder) für die Beckenbodenchirurgie entsprechende physikalische bzw. mechanische und chemische Eigenschaften aufweisen. Dazu gehören:

- leichtgewichtig
- gut Druck belastbar
- nicht schrumpfend
- elastisch
- gut verträglich
- monofil
- großporig
- gut implantierbar
- gut zuschneidbar

1.2 Das Becken der Frau

1.2.1 Anatomie des weiblichen Beckenbodens

Der Beckenboden ist anatomisch ein Gefüge aus Muskel- und Bindegewebeplatten, das die Bauchhöhle kaudal abschließt. Von Petros wird er auch als ein Trampolin beschrieben. Der Beckenboden setzt sich aus dem Diaphragma pelvis, dem Diaphragma urogenitale und der Schwellkörpermuskulatur zusammen^{71;106}.

Bandapparate, die in der Urogynäkologie wichtig sind:

- Sakrouterin Ligament (SUL)
- Sakrospinale Ligament (SSL)
- Arcus tendineus fasciae pelvis (ATFP)
- Uterosacral Ligament (USL)
- Sacrotuberales Ligament (STL)

Diaphragma pelvis:

Das Diaphragma pelvis ist der kraniale muskuläre trichterförmige Teil des Beckenbodens. Gebildet wird das Diaphragma pelvis aus dem Muskulus levator ani und dem

Muskulus coccygeus. Es dient zur Halterung der Beckeneingeweide und unterstützt den Muskulus sphincter ani¹⁰⁶.

Diaphragma urogenitale:

Das Diaphragma urogenitale ist eine trapezförmige, muskulöse, bindegewebige Platte. Dieses befindet sich zwischen der Symphyse, den unteren Schambeinästen bis hin zum Tuber ischiadicum. Das Diaphragma urogenitale wird aus dem Muskulus transversus perinei profundus gebildet und von zwei Faszien, die Fasciae diaphragmatis urogenitalis superior und inferior, ummantelt. An dem sind die Harnröhre und die Schleimdrüsen (Glandulae vestibulares majores) seitlich/mittig platziert¹⁰⁶.

Äußere Beckenbodenmuskulatur:

Die äußere Bodenmuskulatur setzt sich aus einer Anzahl von Muskeln zusammen. Die kaudale Schicht des Beckenbodens wird aus den Dammuskeln, dem M. sphincter ani, dem M. bulbospongiosus und ischiocavernosus und dem M. transversus perinei superficialis gebildet. Der M. sphincter ani externus und M. bulbospongiosus stellen eine „8“ um das Rectum und den Introitus vaginae dar. Der Schwellkörper der Klitoris wird vom M. ischiocavernosus überlappt. Der M. transversus perinei superficialis enthält Fasern des M. transversus perinei profundus, liegt im Damm und ist funktionell irrelevant¹⁰⁶.

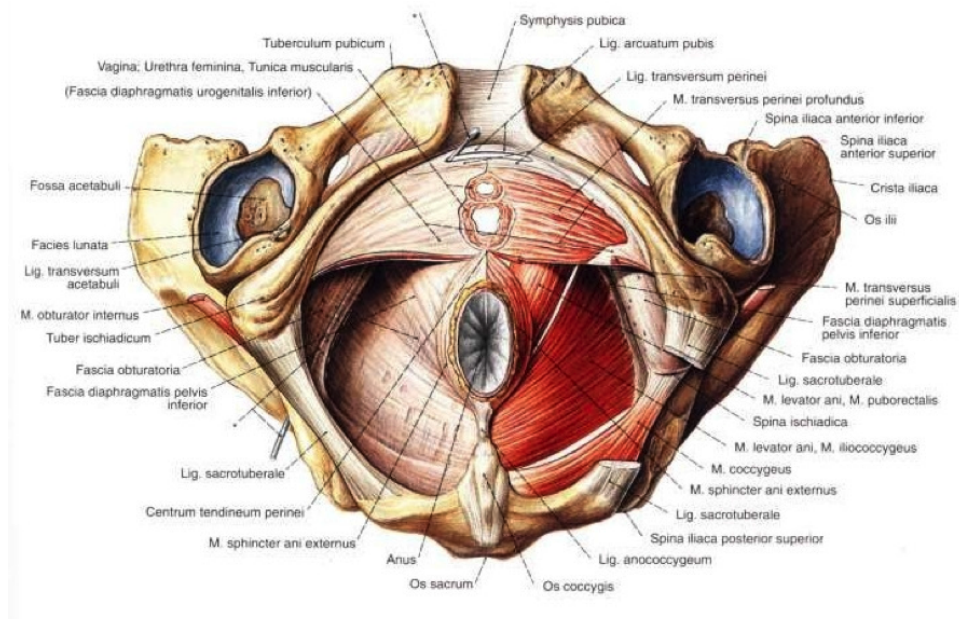
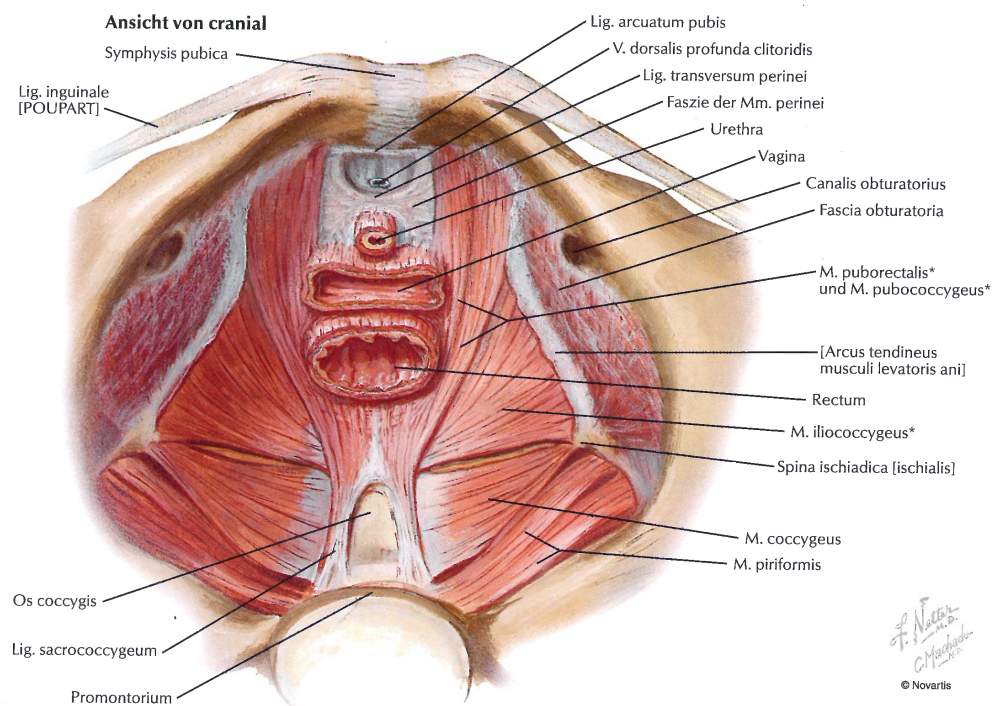
(a) Ansicht caudal⁴(b) Ansicht cranial⁶⁸

Abbildung 1.4: Anatomie des weiblichen Beckenbodens.

1.2.2 Beckenbodendefekte

Beckenbodendefekte entstehen häufig durch Geburten, Alterungsprozesse, angeborene Bindegewebsschwäche, postmenopausalen Hormonmangel, chronische, obstruktive Erkrankungen und Adipositas. Aber auch schwere körperliche Arbeit über einen langen Zeitraum können zu Beckenbodendefiziten führen⁴⁵. Die Schädigungen des Beckenbodens beruhen auf strukturellen Veränderungen des Bandapparates, die dann letztendlich Funktionsstörungen auslösen⁵⁷.

Häufigste Beckenbodendefekte

1. Harninkontinenz

- Belastungsharninkontinenz

Bei der Belastungsharninkontinenz kommt es zu Harnverlust während körperlicher Anstrengung. Es liegen keine Harndrangsymptome vor².

- Urge- bzw. Dranginkontinenz

Hierbei handelt es sich um einen unwillkürlichen Harnverlust. Es wird unterschieden in Detrusorhyperaktivitätsinkontinenz mit Drang (motorische Dranginkontinenz) und Harnröhrenrelaxierungsinkontinenz ohne Drang (sensorische Dranginkontinenz)².

- Mischharninkontinenz

Hier fungieren beide o. g. Harninkontinenzen zusammen^{2;50}.

2. Deszensus und Prolaps

- Deszensus genitalis

Es handelt sich hierbei um ein Herunterfallen des Uterus bis zum Hymenal-

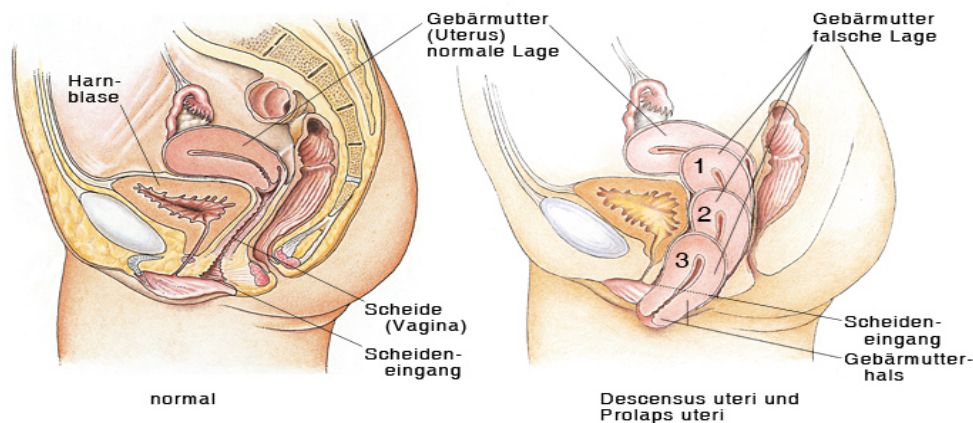


Abbildung 1.5: Transobturatorische Implantation alloplastischer Netze zur Therapie von Beckenbodendefekten. www.eesom.com

saum⁸⁴(siehe Abbildung 1.5).

- Prolaps

Fällt der Uterus über den Hymenalsaum hinaus, so wird dieser Defekt als Prolaps bezeichnet⁸⁴(siehe Abbildung 1.5).

- Zystozele (Descensus vaginae anterior)

Hierbei handelt es sich um eine Ausstülpung der Blase in die Vagina. Die Zystozele tritt oft im Zusammenhang mit Gebärmuttersenkung auf und korreliert häufig mit einer Stressharninkontinenz¹⁰⁶ (siehe Abbildung 1.6).

- Rectozele (Descensus vaginae posterior)

Eine Rectozele entsteht durch Herunterfallen der Scheidenhinterwand, wobei das Rektum mitbeteiligt ist¹⁰⁶(siehe Abbildung 1.6).

- Douglaszele (Enterozele)

Darunter versteht man, dass die Gebärmutter bereits entfernt wurde und sich in der Folge das Scheidenende gesenkt hat¹⁰⁶.

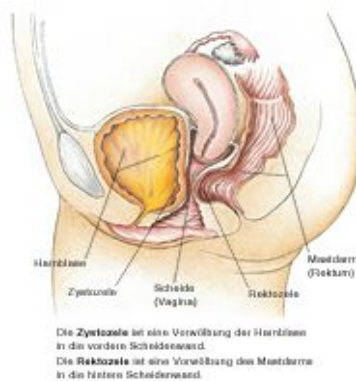


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung von Zysto- und Rectozele. www.eesom.com

Die Urogynäkologie bietet diverse Behandlungsmöglichkeiten. Im Folgenden werden diese kurz beschrieben.

Konservative Therapie

In der konservativen Therapie steht das Beckenbodentraining mit und ohne Elektrostimulation an erster Stelle. Das Beckenbodentraining ist besonders für junge Frauen geeignet. Es wird auch als First-line-Therapie bezeichnet⁴⁸. Diese Methode führt überwiegend bei Stressharninkontinenz zum Erfolg. Eine Kombination mit Biofeedback-Techniken kann eventuell schneller zur Heilung beitragen^{15;91}. Aber auch für ältere Patientinnen kann diese konservative Therapie zusammen mit Sport und Bewegung nach genauer Abklärung der Funktionsstörung und nach Einschätzung der körperlichen Vitalität durchaus sinnvoll sein. Welche Sportarten zur rehabilitativen oder sekundärpräventiven Therapie genutzt werden, sind stets individuell festzulegen^{30;92}.

Pessartherapie

Die Pessare dienen zur Unterstützung der Blase und Gebärmutter. Auch diese Therapie ist besonders für junge Frauen gut geeignet, die ihren Kinderwunsch noch nicht ab-

geschlossen haben, aber auch für ältere morbid Patientinnen. Es wird unterschieden zwischen Ring- und Würfelpessaren¹⁹.

Medikamentöse Therapie

Als Arzneimittel steht hier ein Duloxetin (Yentreve®) zur Verfügung. Duloxetine sind selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer, die zur Behandlung von Frauen mit mittelschwerer bis schwerer Dranginkontinenz eingesetzt werden können⁴⁷. Ebenfalls ist es üblich in der Postmenopause eine vaginale Östrogenisierung durchzuführen. Jedoch ist der Erfolg zwiespältig^{36;45}. Es werden derzeit mehr prospektive Studien zur medikamentösen Therapie empfohlen.

Operative Therapie

Transinjektion

Hierbei handelt es sich um eine Injektionstherapie mit einem „bulking agent“ zur Unterpolsterung der Harnröhre. Diese Art der Behandlung zählt nicht zu den Standardverfahren in der Primärtherapie⁴⁸.

Abdominale/laparoskopische Kolposuspension

Diese abdominale Operationsmethode nach Burch wurde in der Vergangenheit als Goldstandard in der Urogynäkologie^{19;48} angesehen.

Suburethrale Schlingen

Die suburethrale Bandeinlage nach Ulmsten hat die abdominale/laparoskopische Kollposuspension nach Burch weitgehend ersetzt. Diese TVT- („Tension free Vaginal Tape“) und TOT-Operationen (Trans-Obturator-Technik) werden mit einem makroporösen, nicht resorbierbaren Band aus PP in Lokal-, Regional- oder Allgemeinanästhesie durchgeführt. Heute wird diese suburethrale Schlingenoperation als Standardverfahren in der Inkontinenzchirurgie genutzt¹⁹.

Deszensuschirurgie

Auch in der Deszensuschirurgie gibt es eine Vielzahl von Operationstechniken. Eine davon stellt die abdominale Sakrokolpopexie dar. Gleichmaßen nehmen die vaginalen Netzoperationen hier an Bedeutung zu. So konnte beispielsweise durch Nutzung der Polypropylenetze eine Stabilisierung der Zysto- und Rectozele sowie des Uterus bzw. Scheidenendes erreicht werden^{19;35}.

2 Zielstellung

Während zahlreiche Studien zum Einfluss der Oberflächenstruktur polymerer Kunststoffnetze auf entzündliche Gewebereaktionen um Implantate vorliegen, gibt es bislang kaum weiterführende Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene. Die Prüfung der Gewebeverträglichkeit von Biomaterialien *in-vitro* ist eine anerkannte und valide Methode mit dem Vorteil, dass die experimentellen Bedingungen sehr gut standardisierbar sind. Lebende Zellen reagieren sehr sensitiv auf Fremdmaterialien. Außerdem erhält man Aufschluss über direkte Effekte der Biomaterialien auf den Metabolismus und das Wachstumsverhalten der Zellen.

In der Studie werden zum ersten Mal anhand von Biomaterialien, die in der Urogynäkologie derzeit verwendet werden, systematische *in-vitro* Untersuchungen zum Einfluss der Netzstruktur unterschiedlich konstruierter Netze auf Morphologie und das Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten über einen Inkubationszeitraum von 12 Wochen vorgenommen. Vorliegend erfolgten *in-vitro* Untersuchungen zur Adhärenztestung von Fibroblasten auf verschiedenen Netz- und Bandkonstruktionen. Die Testung beinhaltet zunächst lichtmikroskopische Verlaufsbeobachtungen zur Beurteilung der Zellmorphologie. Des Weiteren wird immunhistochemisch mit dem spezifischen Fibroblastmarker Vimentin das Einwachsen der Fibroblasten in die unterschiedlichen Netzmaschen geprüft. Der Erweis auf Reinheit der primären Zellkulturen soll mittels CD 68 Leuko- und

Monozyten-Marker gelingen. Neben den humanen, homologen Zellen, die aus subepitheliale Frischgewebe (Operationsgewebe) stammten, kommen zusätzlich kommerzielle Fibroblasten zum Einsatz. Es wird eine zeitliche Quantifizierung des Fibroblastwachstums in das Netzmaterial einmal mittels der Zellzählung (Trypanblau) und zum anderen durch molekularbiologische Testverfahren (iCycler) vorgenommen. Ein weiteres quantitatives Verfahren für die Adhärenz liefert das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ. Der Zellbewuchs der Netze wird licht- und elektronenmikroskopisch sowie mittels Videoaufnahme dokumentiert. Die Analysen der Glykolyse, des oxidativen Stress und die pH-Wert-Messungen bringen Aussagen zum Metabolismus der genutzten Zellen mit und ohne Mesh-Kontakt. Zur Testung stehen resorbierbare, nicht und teilresorbierbare und gemaschte Materialien (Polypropylen; Polypropylen/PGACL; Polyvinylidendifluorid; Kollagen) zur Verfügung. In der Studie sind insgesamt 19 Netzmuster (monofil; multifil), z.T. beschichtet mit Titan und Silber, impliziert. Die in diesem Projekt verwendeten Implantate werden mit der Energiedispersiven-Röntgen-Mikrobereichsanalyse (EDX) auf ihre chemische Zusammensetzung qualitativ und quantitativ analysiert. Die additive Wirkung von Estradiol und Progesteron wird immunhistochemisch untersucht. Apoptose-, Vitalitäts- und Proliferationsuntersuchungen können ebenfalls immunhistochemisch und anschließend in einem Zweit- und Drittverfahren mit kommerziellen Bioassays und mit der FACS-Analyse bestätigt werden. Zusätzlich sollen Untersuchungen zu physiologischen und pharmakodynamischen Effekten mit Netzmaterialien an humanen Fibroblastzellen erfolgen. Im beigefügten Videoclip ist das Adhärenzverhalten der Fibroblasten am TiLOOP® -Netz in den ersten 60 h dokumentiert. Im finalen Kapitel der Arbeit wird geklärt, wie die gewonnenen Resultate auch in der Praxis reflektiert werden.

Das formulierte Ziel dieser Studie ist, durch einen minimalen Einsatz von Biomateria-

2 Zielstellung

lien regenerative körpereigene Prozesse zu unterstützen, die ohne den Einsatz dieser Materialien kaum bzw. nicht möglich wären. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung verbesserter Netziimplantatmaterialien. Insbesondere heißt dies, dass mit diesem Forschungsvorhaben ein neues verbessertes Netziimplantat entwickelt wird, welches in der Beckenboden- und Hernienchirurgie zur Rekonstruktion von erschlafftem Gewebe eingesetzt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Biomaterialien

3.1.1 Netze

Als synthetische Implantate standen resorbierbare, teilresorbierbare und nicht resorbierbare Bänder und Netze zur Verfügung. Dabei konnte zwischen beschichteten und unbeschichteten, monofilen und multifilen Materialien unterschieden werden. Bei der Beschichtung der Materialien handelte sich es um eine Titan- und Silberveredelung. Der nicht resorbierbare Stoffanteil bestand entweder aus Polypropylen (PP) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF). PP gehört zu den Thermoplasten und ist bei den Polyolefinen integriert¹⁰⁷. PP entsteht durch Polymerisation des Propens (Abbildung 3.1).

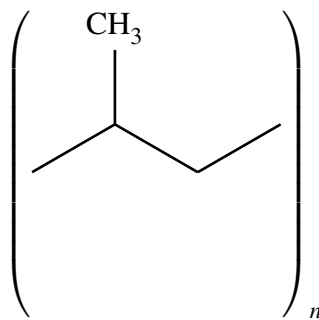
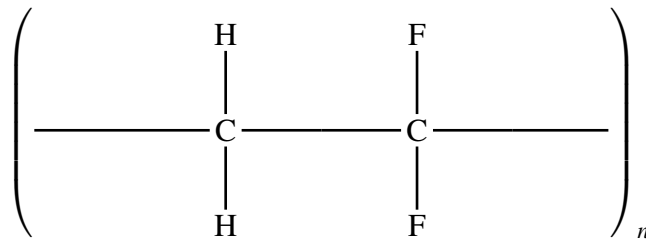


Abbildung 3.1: Summenformel des PP¹⁰⁷.

Abbildung 3.2: Summenformel des PVDF^{43;108}.

Auch PVDF zählt zu den Thermoplasten. Das PVDF wird aus Fluorwasserstoff und Methylchloroform hergestellt. Daraus bildet sich zunächst Chlordifluorethan welches zu Vinylidendifluorid wird. Durch Einwirkung von Katalysatoren und definierten Temperaturen und verschiedenen Drücken entsteht das Polyvinylidendifluorid. Mit der in Abbildung 3.2 gezeigten Summenformel lässt sich dieser thermoplastische Fluorkunststoff darstellen.

Die resorbierbaren Stoffanteile setzten sich aus Polyglactin (PGLactlin) oder Polyglycolsäure-E-Caprolacton (PGACL) zusammen⁸². Die Implantate wurden zur Testung von der Fa. SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG (Naila; Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die o. g. Firma lieferte hauptsächlich eigene Implantate aber auch Implantate von Fremdfirmen. Das Unternehmen SERAG WIESSNER entwickelte sich 1960 aus dem Zusammenschluss der Catgutfabrik Carl Wiessner (gegründet 1866) und der SERAG Cutgutfabrik. Es ist ein mittelständiges Unternehmen und gilt bislang als ältester deutscher Hersteller von chirurgischen Nahtmaterialien. Derzeit beteiligen sie sich mit großem Erfolg auch an der Entwicklung textiler Implantate für die Viszeral- und Beckenbodenchirurgie⁶⁷.

Von folgenden Firmen konnten Netze und Bänder genutzt werden:

- SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG
- Johnson & Johnson Medical GmbH Ethicon

- Dahlhausen
- pfm medical ag
- Johnson & Johnson Medical GmbH Gynecare
- Bard
- Medtronic Covidien (Tyco)
- AMS

Insgesamt standen 19 verschiedene Netzmuster zur Verfügung. Davon zählten 2 Netze zu den teil-/resorbierbaren Materialien. Es handelte sich einerseits um das VYPRO®II (Vicryl® -Prolene-Composite) und andererseits um das Pelvi-Soft (100 % Kollagen)²⁹. Aufgrund deren Stoffreduzierung konnten diese beiden resorbierbaren Netze nur bedingt in die Untersuchungen mit einbezogen werden. Die restlichen 17 Netze (teil- und nicht resorbierbar; be- und unbeschichtet), sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Verwendete Netzmuster

Netz	Material ⁱ	teilresorbierbar	nicht resorbierbar	beschichtet	unbeschichtet
SERASIS PP	100 % PP, monofil		ja		ja
SERATOM PP	100 % PP, monofil		ja		ja

Fortsetzung Verwendete Netzmuster

Netz	Material ⁱ	teilresor- bierbar	nicht re- sorbierbar	beschich- tet	unbe- schichtet
SERATOM Ti	PP + Ti- Beschich- tung		ja	ja	
SERAMESH UL	100 % PP, monofil, große Poren		ja		ja
SERAMESH PA	PP/ PGACL	ja			ja
SERAMESH SE	100 % PP, multifil, kleine Poren		ja		ja
SERAMESH SO	100 % PP, monofil, kleine Poren		ja		ja

Fortsetzung Verwendete Netzmuster

Netz	Material ⁱ	teilresor- bierbar	nicht re- sorbierbar	beschich- tet	unbe- schichtet
SERAMESH LE	100 % PP, multifil, große Poren		ja		ja
SERAMESH Ag	PP + Ag- beschichtet		ja	ja	
Pelvitex/Schwein/	Kollagen	ja			
Gynemesh PS	100 % PP		ja		ja
DYNAMESH SIS	PVDF		ja		ja
SERASIS PA	PGACL + PP + Ca- prolacton + Copolymer		ja		ja
SERATOM Ag	PP + Nano- silber		ja	ja	
Ultrapro	PP/ PGACL Große Poren	ja			ja

Fortsetzung Verwendete Netzmuster

Netz	Material ⁱ	teilresorbierbar	nicht resorbierbar	beschichtet	unbeschichtet
TIMESH	PP + Ti- beschichtet		ja	ja	
VYPRO II	PP/ PGLactin	ja			ja

ⁱ PP: Polypropylen; PGLactin: Polyglactin; Ti: Titan; Ag : Silber; PGACL: Polyglycolsäure-E-Caprolacton; PVDF: Polyvinylidendifluorid

Handhabung der Netze

Für den Versuch wurden jeweils 10 mm x 10 mm große sterile Netzstücke gestanzt und in die Reservoirs einer 24 Well-Zellkulturplatte (Fa. Biochrom AG) eingeklebt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Netze richtig auf dem Boden der Vertiefungen ohne Faltenbildung lagen. Zum Kleben stand ein spezieller UHU-Kleber®-Hart (UHU GmbH Co. KG) zur Verfügung. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen mit Nutzung der Sicherheitswerkbank. Zusätzlich wurden die Netzstücke in der 24 Well-Zellkulturplatte mit UV-Licht behandelt, um eine eventuell auftretende Kontamination auszuschließen.

Qualitative und quantitative EDX-Analyse

Zur Ermittlung der chemischen Zusammensetzung der genutzten Netze konnte die EDX-Analyse, ein Oberflächenanalyseverfahren, genutzt werden. Dabei handelt es sich um

eine Röntgen-Mikrobereichsanalyse. Die Analyse erfolgte am Rasterelektronenmikroskop (REM) und einem speziellen Röntgen-Analysator (EDX-Detektor, Kevex).

Durch die Bestrahlung mit einem Primärelektronenstrahl kommt es im REM zu einer elementspezifischen Röntgenstrahlung, die detektiert wird. Es entsteht eine elementtypische Röntgenfluoreszenzstrahlung, welche mit einem energie- (EDX) oder wellenlängendispersiven (WDX) Detektorsystem aufgezeichnet wird und die chemische Analyse möglich macht³⁴. Die EDX-Analyse gab Aufschluss über den prozentualen Massegehalt der einzelnen Stoffe in den Netzen.

3.2 Zellmaterialien

Zur Testung der Maschenwaren auf Biokompatibilität standen gewebespezifische Fibroblasten zur Verfügung. Fibroblasten synthetisieren die Komponenten der Intrazellulärsubstanz, die Grundsubstanz und die Fasern. Sie befinden sich im Organismus sowohl im sich entwickelnden bzw. wachsenden Bindegewebe, als auch im ausdifferenzierten lockeren Bindegewebe. Der Entwicklung nach ist der Fibroblast mesenchymaler Herkunft und die Vorstufe vom Fibrozyten. Demnach gehören Fibroblast und Fibrozyt zum gleichen Zelltyp. Der Unterschied besteht in ihren Aktivitätszuständen. Aus den Fibrozyten entsteht hauptsächlich das Kollagen, das zusammen mit Proteoglykanen zur Festigung der Extrazellulärmatrix führt. Funktionell sind Fibroblasten maßgebend an der Heilung von Gewebeverletzungen beteiligt^{54;102}.

Im Einzelnen standen nicht nur kommerzielle Fibroblastzelllinien (NHDF-p adult; PromoCell) für Testzwecke zur Verfügung, sondern es konnte ein Modell entwickelt werden, welches es ermöglichte, ständig auf primäre Fibroblastzellen zurück zugreifen. In

die Untersuchungen flossen insgesamt 122 Primärzellkulturen und eine kommerziell erworbene Fibroblastzelllinie ein. Die Aufteilung soll im Folgenden veranschaulicht werden.

Kommerziell erworbene Fibroblastzellen Die kommerziellen Zellen stammten aus der Fa. PromoCell GmbH (bioscience alive, Heidelberg, Deutschland). Es handelte sich dabei um die NHDF-p adult Zellkultur (Normal Human Dermal Fibroblasts, Cat. Nr. C 12352).

Primärzellen Zum Teil gelang es, die Zellkulturarbeiten mit selbst angelegten Primärkulturen von betroffenen Patienten (Harninkontinenz oder Blasenschwäche) durchzuführen. Das Biopsiematerial (frisches, subepitheliales Operationsgewebe) stellte die Universitätsfrauenklinik Rostock zur Verfügung. Die Patienten gaben vor der Operation ihre Zustimmung. Ein Ethikvotum lag vor. Das Durchschnittsalter der Patientinnen, von denen das Biopsiematerial stammte, betrug 55 Jahre (38-72 Jahre).

Isolierung der humanen Fibroblasten aus subepithelialem Operationsgewebe Zur Anzucht der primären Zellen standen jeweils ein ca. 30 mm² großes Stück subepitheliales Gewebe von Probandinnen zur Verfügung, welches in drei bis vier kleinere Segmente zerteilt, enzymatisch mit Collagenase (Fa. PAA; 3 h - 4 h; 37°C) aufbereitet und dann bis zur Bildung eines Monolayers in Kulturmedienflaschen (Kulturfläche 25 cm², Biochrom AG) kultiviert wurden. Als Nährmedium diente ein spezifisches Fibroblastmedium 2 (Fa. PromoCell), supplementiert mit 1 % Penicillin/ Streptomycin (100x; Fa. Sigma) und Amphotericin B (250 µl/ml; Fa. PAN Biotech GmbH). Die Kultivierung der Zellen lief unter sterilen und physiologischen Bedingungen im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂, sowie einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre ab. Bei einer Kon-

fluenz von ca. 70 % - 90 % wurden die Fibroblasten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (DetachKit-250; Fa. PromoCell) trypsiniert und zum „Splitten“ in größere Kulturfaschen (Kulturfläche 75 cm² oder 150 cm², Biochrom AG) ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle 48 h. Lagen ausreichend Zellen in Kultur vor, konnten diese für die Versuche eingesetzt werden⁸¹.

3.2.1 Zellkultur

Zellkulturmedium Zur Kultivierung der Fibroblasten wurde das Basismedium Fibroblast Growth Medium 2 (Fa. PromoCell) verwendet. Zuvor wurde das Medium mit dem Supplement-Mix Fibroblast Growth Medium 2 (Fa. PromoCell) versetzt, welches u. a. Serumproteine, Wachstumsfaktoren und verschiedene Hormone enthielt. Darüber hinaus erfolgte eine Zugabe von Penicillin/Streptomycin (100x; Sigma-Aldrich) zur Verhinderung bakterieller Kontaminationen und Amphotericin B (PAN Biotech GmbH; 250 µl/ml) zur Vermeidung von Pilzinfektionen⁶².

Lagerung der Zellen Die primären und kommerziellen Fibroblasten lagerten vor Versuchsbeginn mit einem speziellen Einfriermedium in flüssigem Stickstoff bei -188°C.

Auftauen und Ausplattieren der Zellen Für die Kultivierung mussten die im Einfriermedium konservierten Zellen zügig aufgetaut werden. Vor ihrer Nutzung galt es, das im Einfriermedium enthaltene, organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zu eliminieren. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen in 5 ml Zellkulturmedium/10 % FKS überführt, gevortext und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und dann dekantiert. Anschließend kam zu dem Pellet frisches (5 ml) Zellkul-

turmedium. Dann fand das Resuspendieren und Pipettieren der Zellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche statt. Die Inkubation der Zellkulturen wurde unter sterilen physiologischen Bedingungen (37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre) in einem Inkubator durchgeführt³⁷.

Mediumwechsel Damit die Zellen vital blieben, wurden sie alle 48 h mit neuem Kulturmedium versetzt. Mit Hilfe einer Pipette konnte das verbrauchte Medium abgenommen und 5 ml frisches Nährmedium zugegeben werden.

Passagieren der Zellen Beim Erreichen einer Konfluenz von 70 % - 90 % in der Zellkulturflasche wurden die Zellen passagiert. Dafür das verbrauchte Medium dekantieren und den Zellrasen mit 5 ml PBS spülen. Nach Zugabe von Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH; 0,05 %/ 0,02 %) erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 37°C, zur Trypsinierung. Hatten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (Überprüfung mittels Lichtmikroskop), konnten diese in ein 50 ml Röhrchen aufgenommen und der Trypsinierungsvorgang mit der 1,5fachen Menge 10 % FKS-haltigem Nährmedium abgestoppt werden. Die daraus resultierende Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach erfolgte die Resuspendierung des Pellets mit einer definierten Menge an frischem Zellkulturmedium, anschließend nochmal gevortext und die Suspension in eine neue größere Zellkulturflasche (75 cm² oder 150 cm²) überführt bzw. auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt oder zum Zellversuch genutzt³⁷. Die Abbildung 3.3 zeigt das Wachstum der Fibroblasten im Monolayer.



Abbildung 3.3: Konservative und konfluente Fibroblasten als Monolayer; Skalierungsbalken = 250 μm .

Kryokonservierung der Zellen Zellen, die nicht zeitnah verwendet werden konnten, lagern im flüssigen Stickstoff bei einer Temperatur von -188°C . Dafür mussten die Fibroblasten in den Zellkulturflaschen mit 5 ml PBS gewaschen, trypsinisiert (s. o.) und mit einer definierten Konzentration an Zellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in ein Einfriermedium aufgenommen werden. Das Einfriermedium ist ein Gemisch aus 20 % FKS, 10 % DMSO und 70 % Zellkulturmedium³⁷. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (1,5 ml; Fa. Eppendorf) aliquotiert und für 24 h unter Verwendung eines Kryoeinfriergerätes mit einer Abkühlrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ schonend bei -80°C vorgefroren. Danach konnten die Zellen bei -188°C im flüssigen Stickstoff konserviert werden⁶².

Zellzahlermittlung/Vitalitätstestung Für die Untersuchungen wurde eine bestimmte Lebendzellzahl benötigt. Mit Hilfe der Bürker-Zählkammer konnte die Zellzahl ermittelt werden (Abbildung 3.4a und b). Hierfür wurde eine Zellverdünnung 1:20 (360 μl Medium + 20 μl Trypanblau + 20 μl Zellsuspension) vorgelegt. Trypanblau ist ein Azofarbstoff. Dieser Farbstoff bindet an zytosolische Proteine und kann demzufolge durch die Zellmembran von toten Zellen dringen, welche dann unter dem Lichtmikroskop

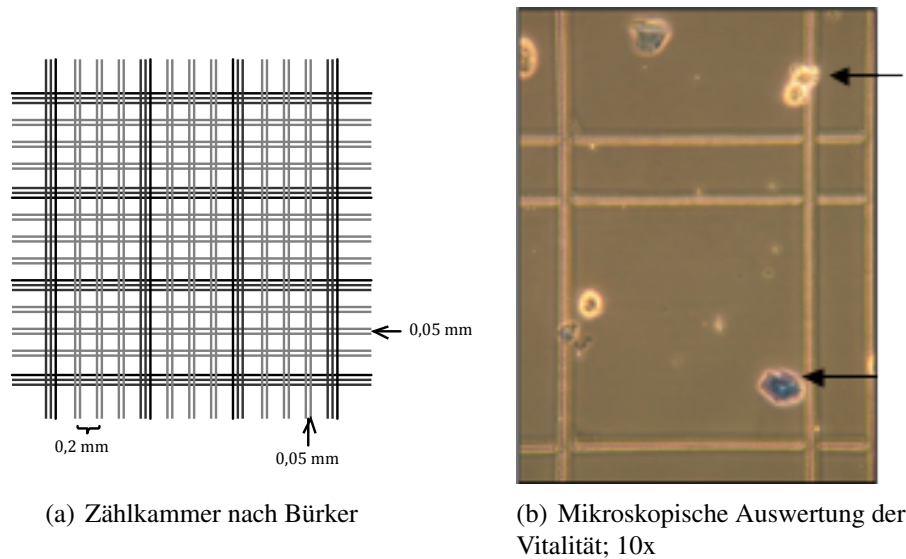


Abbildung 3.4: Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit einer Bürker-Zählkammer.⁹⁸ Farblos = vitale Zelle, Blaufärbung = letale Zelle.

(Axiostar plus, Fa. Zeiss) blau erscheinen. 10 µl der o. g. Zellverdünnung wurden in die Zählkammer beidseitig pipettiert. Zur Bestimmung der Zellzahl war es nötig, 25 Quadrate aus beiden Kammern auszuzählen. Es wurden die ungefärbten und gefärbten Zellen ermittelt. Die Zellzahlberechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$Zellzahl \cdot 10 \cdot 10^4 = vitaleZellen/ml \quad (3.1)$$

Dabei entspricht Zellzahl den gezählten ungefärbten Zellen aus 2x25 Quadraten, 10 dem Verdünnungsfaktor und 10^4 dem Faktor der Kammertiefe.

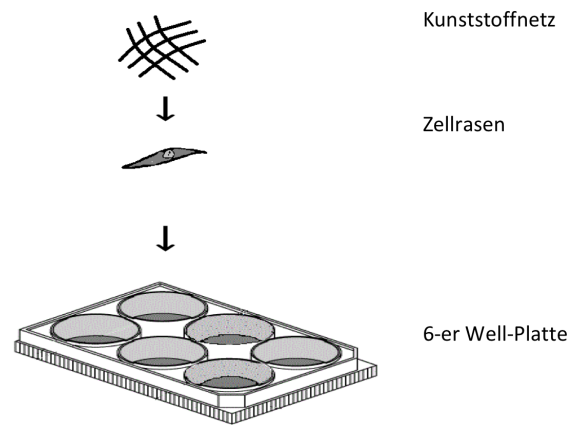
Der Anteil vitaler Zellen [%] berechnet sich aus der Anzahl blaufärbter Zellen geteilt durch die Gesamtzellzahl in der Bürker-Zählkammer (siehe Abbildung 3.4)^{5;63}.

3.3 Versuchsaufbau

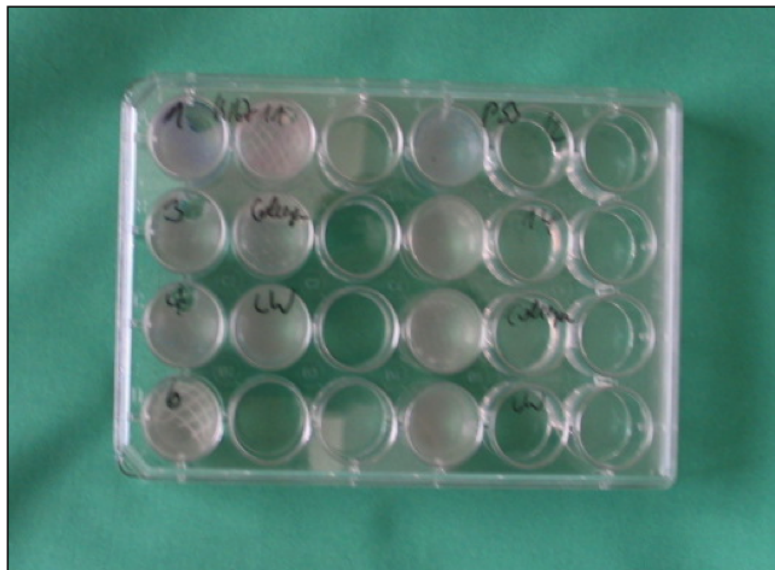
Für jeden Ansatz (Zellen + Medium + Netz) galt eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Es wurden in die 24Well-Platten-Reservoirs mit den eingeklebten Netzstücken jeweils die definierte Menge von 2 ml Zellkultursuspension pipettiert (Abbildung 3.5).

Anschließend erfolgte im Inkubator unter sterilen Bedingungen (37°C ; 5 % CO_2 und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre) die Kultivierung. Die Inkubationszeit betrug insgesamt 12 Wochen. Wöchentlich gelang eine morphologische Analyse mit dem Lichtmikroskop. Ebenfalls wurden regelmäßig (1x wöchentlich) in Zellkulturüberständen der pH-Wert und die Glykolyse geprüft. Zusätzlich erfolgte eine Messung des oxidativen Stresses mit dem BIOVISION-Assay am Plattenreader.

Die Charakterisierung der Fibroblasten mit Vimentin, der Nachweis natürlicher Apoptose mit p53 und die Testung der Proliferation mit Ki 67 bei Netzkontakt gelang zunächst immunhistochemisch und im Zweitverfahren (LDH, MTT; BrdU; Fa. Roche) biochemisch mittels ELISA-Tests. Ebenso wurde der Rezeptorstatus (ER α und PR) der verwendeten Zellen immunhistochemisch detektiert. Die primären Zellen konnten auf Reinheit mit dem CD 68 Marker visualisiert werden. Analog zu den immunhistochemischen (qualitativen) Apoptosenachweisen erfolgten die quantitativen Apoptoseuntersuchungen mittels Zellzyklusanalyse (FACS-Analyse). Mit der Real-Time PCR und mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ war die Quantifizierung des Zellwachstums möglich. Am Versuchsende erfolgten eine erneute Zellzählung und Vitalitätsprüfung mit Trypanblau, sowie die Endpunktanalysen mit Hilfe des Licht- und Rasterelektronenmikroskopes, die bildlich dokumentiert wurden. Parallel zu den Versuchen bot sich die Möglichkeit zur Bestimmung der physiologischen und pharmakodynamischen Effekte mit Netzmaterial an humanen Zellen (Fa. Bionas GmbH). Die Prüfung beinhaltete die



(a) Schema Zellaussaat



(b) Photographische Darstellung des Versuchsaufbaus

Abbildung 3.5: Well-Zellkulturplatte mit Netzvarianten und Zellkultursuspension.

Untersuchung der metabolischen Beeinflussung durch Netzextrakte auf Fibroblasten.

3.3.1 Testverfahren

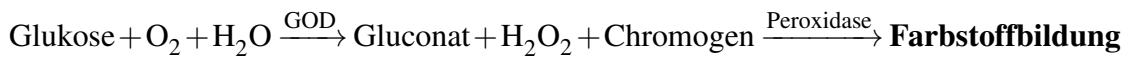
pH-Wert-Analyse

Die pH-Wert-Analysen erfolgten mit der pH-Elektrode ORION 3 Star™ pH Benchtop (Fa. Thermo Scientific) kontinuierlich (1x wöchentlich) beim Mediumwechsel in den Zellkulturüberständen. Ein physiologischer und stabiler pH-Wert ist ein essentieller Marker für die Funktionalität von Zellen und Geweben. Bei fortschreitendem provoziertem Zelltod kommt es zur Störung des oxidativen Stoffwechsels mit darauf folgender anaerober Glykolyse. Durch die geschädigten Plasmamembranen wird u. a. Laktat frei und führt zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raums und eine pH-Wertänderung ist impliziert. Somit stellt die pH-Wertmessung eine ergänzende Methode zur Beurteilung der Zellvitalität dar³⁷. Ein Biomaterial, welches enorm hohe pH-Wert-Änderungen hervorruft, kann sich schädlich auf den Organismus bzw. auf Organe auswirken.

Glukosebestimmung

Die Bestimmung des extrazellulären Glukosegehalts im Zellkulturüberstand ist ein Maß für den glykolytischen Abbau der Glukose in den Zellen. Fällt die Glukose ab, spricht das für einen guten Stoffwechsel der Zelle. Ebenso gilt der Abbau der Glukose auch als ein indirekter Hinweis auf die Zellvitalität, da die Transportfähigkeit und die Verstoffwechselung von Glukose bei Zerfall der Zelle vermindert ist. Dabei kommt es zum extrazellulären Anstieg von Glukose, da dies über den jeweiligen Transporter nicht mehr realisiert werden kann. Demzufolge sind im Ergebnis höhere Glukosewerte gegenüber den Ausgangswerten zu erwarten. Für die Glukose-Messung wurden jeweils

aus den Ansätzen 20 µl Zellkulturüberstand in 1 ml Pufferlösung (spezielle Glukose-Systemlösung; Fa. Biosen) überführt. Die Messung erfolgte am Glukose/Laktat - Automaten (Fa. Biosen). Das enzymatische Verfahren, das zur Verfügung stand, beruht auf der reduzierenden Wirkung der Glukose mit dem Enzym Glukoseoxidase (GOD)⁵². Im Folgenden ist das Prinzip der enzymatischen Glukoseanalyse dargestellt.



Oxidativer Stress

Mit dem Hydrogen Peroxide Assay Kit von BioVision wurde die Messung des oxidativen Stresses realisiert. Im oxidativen Stresstest ist das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) der quantitative Parameter. Als Vitalitätshinweis bei diesem Test gilt die Tatsache, dass das Redox-System der Fibroblastzelle, also der Schutzmechanismus dieser Zellen, in unterschiedlichem Maße aktiviert wird. Durch photometrische Messungen wird die Wasserstoffperoxidmenge im Nanomol-Bereich [nmol] ermittelt. Durch diese Menge wird ersichtlich, in welchem Ausmaß das zelleigene Redox-System durch den Kontakt mit Netzstrukturen aktiviert ist. Die ermittelten Konzentrationen konnten mit Standardwerten quantifiziert werden. Der Normbereich liegt bei 40 nmol.

Vor der Testdurchführung wurden nach Vorschrift die Reagenzien (OxiRed™ Probe-Lösung und Horse Radish Peroxidase (HRP)-Lösung) angesetzt, indem das OxiRed™ in 220 µl DMSO und das HRP in 220 µl H_2O_2 -haltigen Assay Puffer gelöst wurden. Die Bestimmung erfolgte nach 48 h Zellaussaat (Zellen mit und ohne Mesh-Kontakt). In eine 96Well-Platte wurden 50 µl Zellkulturüberstand gefüllt. Für das kolorimetrische Assay wurden zunächst verschiedene H_2O_2 -Verdünnungen hergestellt, so dass letztendlich Konzentrationen von 0, 1, 2, 3, 4 und 5 nmol/Well H_2O_2 vorlagen. Anschließend

wurde in jedes Well der Reaktionsmix (50 µl), bestehend aus 48 µl H₂O₂-haltigen Assay Puffer, 1 µl OxiRed™ Probe-Lösung und 1 µl Horse Radish Peroxidase (HRP)-Lösung, pipettiert. Nach solidem Vortexen inkubierte der gesamte Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur. Das Absorptionsmaximum des entstandenen Farbstoffes liegt bei 570 nm und die Messung erfolgte am ELISA-Reader (Fa. BioRad GmbH). Die Konzentration an H₂O₂ in der Probe verhält sich zur gemessenen optischen Dichte proportional. Je nach Höhe der optischen Dichte entwickelt sich die Farbreaktion intensiver. Dementsprechend hoch ist der oxidative Stress in der Zelle.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist ein qualitatives bzw. semiquantitatives Verfahren, in dem die Spezifität von Antikörpern ausgenutzt wird. Mit dieser Methode werden Proteine und deren Verteilung nachgewiesen. Die Antikörper (AK) sind markiert und dienen zur Proteinlokalisierung⁵. Der verwendete monoklonale Primärantikörper bindet an ein spezifisches Antigen (AG). Es entsteht ein Immunkomplex. Darauf folgend bindet ein spezifischer biotinylierter sekundärer AK den Komplex. Dieser Zweitantikörper ist mit einem Enzym markiert. Durch Zugabe eines Substratkits (Lin RED/GREEN) für Peroxidase kommt es zu einer chemischen Reaktion, die farblich detektiert ist und somit lichtmikroskopisch beurteilt werden kann. Die Immunhistochemie wurde

- zur Charakterisierung der Fibroblastzellen mit Vimentin
- zur Reinheitstestung der primären Zellkulturen mit CD 68 AK
- zum Nachweis des ERα und PR
- zum qualitativen Proliferationsnachweis mit dem Marker Ki 67

- zum qualitativen Apoptosenachweis mit dem Marker p53

genutzt. Die Visualisierung der Marker bzw. Rezeptoren gelang mit dem Detektion-Kit ImmPRESS™ Universal Kit (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame). Dabei handelt es sich um ein sehr sensibles und spezifisches Immunperoxidase-System. Zum Teil wurde an den Präparaten eine Gegenfärbung mit Hämalun (Fa. Sigma Aldrich) durchgeführt. Dadurch konnten die Zellkerne der Fibroblasten deutlicher dargestellt werden⁹⁹.

Qualitativer Apoptosenachweis mit dem Marker Wild-Typ p53 In die immunhistochemischen Untersuchungen wurde auch das p53 Onkoprotein einbezogen, vorliegend als R.T.U. Der MAK p53 (Fa. DAKO) diente zum Nachweis der natürlichen Apoptose (programmierter Zelltod). Als Zelltranskriptionsfaktor hat p53 eine große Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus. Es ist verantwortlich für das Wachstum der Zelle. Dieses Protein p53 ist ein sogenanntes Nummerprotein. Das Tumorsuppressorgen p53 ist in gesunden Gewebezellen vorhanden und somit mit dem entsprechenden MAK nachweisbar²⁰.

Qualitativer Proliferationsnachweis mit dem Marker Ki 67 Ki 67 ist ein Protein, welches zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen genutzt wird. Es zeigt sich in der Interphase im Inneren des Zellkerns. Das Protein wird während der aktiven G1-, S-, G2- und M-Phase (Mitose) des Zellzyklus exprimiert, jedoch in der ruhenden G0-Zellzyklusphase nicht. Aufgrund dieser Tatsache kann es zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellpopulation herangezogen werden^{11;13}. Als Ki 67 Marker stand der MIB-1 Antikörper (Fa. DAKO; Molecular Immunology Borstel) zur Verfügung. Der MAK wurde 1:40 verdünnt⁹⁰.

Nachweis des Estrogen (ER α)- und Progesteron (PR)-Rezeptors Der Nachweis der Rezeptoren stellt einen wichtigen Fakt bei der Hormonersatztherapie dar. Die Hormonersatztherapie verhindert u. a. Atrophien und Entzündungen des Urogenitalbereiches. Fibroblasten können Estrogen- und Progesteron-Rezeptoren besitzen. Dadurch ergibt sich experimentell die Möglichkeit, Stimulationsversuche im Zusammenhang mit den Adhärenzvorgängen durchzuführen. Alle verwendeten Zellkulturen wurden einer Rezeptorbestimmung (ER α und PR) unterzogen³¹. Der Nachweis erfolgte immunhistochemisch. Als MAK konnten der ER α und PR von der Fa. DAKO genutzt werden. Beide MAK lagen als R.T.U. vor.

Charakterisierung der Fibroblastzellen mit Vimentin und Reinheitstestung der primären Zellkulturen mit dem CD 68 AK Vor Nutzung der selbst isolierten, primären Zellen, wurden diese immunhistologisch mit Vimentin, einem Fibroblastmarker, charakterisiert und auf Reinheit mit dem CD 68 Marker (Multimarker für andere humane Gewebezellen) geprüft. Beide MAK waren kommerziell von der Fa. DAKO als R.T.U. erworben. Vimentin ist ein Intermediärfilament und kommt in mesenchymalen Zellen vor. Der MAK Vimentin bindet an dem Intermediärfilament spezifisch und wird deshalb zur Identifikation von Fibroblasten eingesetzt. CD 68 ist ein Glykoprotein, das Lipoproteine geringer Dichte bindet. Es wird von Monozyten/Makrophagen exprimiert⁴². Die Fibroblastenzellkultur erweist sich als Reinkultur, wenn die immunhistochemische Reaktion mit dem MAK CD 68 negativ ist.

Durchführung der Immunhistochemie In einer 12 Well-Zellkulturtestplatte wurden 2 ml/Well Zellsuspension mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach Ausbildung der Morphologie und bei einer Konfluenz von 70 % - 90 % wurde zu-

nächst das Medium dekantiert. Im Anschluss folgte eine PBS-Spülung, um überschüssiges Eiweiß von den Zellen zu entfernen. Danach schloß sich eine 30minütige Fixierung der Zellen mit Formafix (4 %) an und nach 3maligem Waschen mit PBS konnte durch Zusatz von H_2O_2 (0,3 %) die endogene Peroxidase blockiert werden. Anschließend erfolgte eine Spülung mit PBS (3x) und eine Inkubation mit normalem Pferdeserum (R.T.U. 2,5 %; ImmPRESS™) für mindestens 20 min. Dieser Reaktionsschritt schließt eventuell auftretende unspezifische Proteininteraktionen aus und dient zur Verhinderung des „Background“ beim Färbungsprozess. Nach der Inkubationszeit mit normalem Pferdeserum folgten Dekantieren und Pipettieren des jeweiligen MAK (50 µl) mit definierter Konzentration (Vimentin; CD 68, PR, Ki 67, p 53 und $\text{ER}\alpha$ = R.T.U.). Der primäre MAK verblieb über Nacht bei 8°C auf den Zellen in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde wieder dreimal mit PBS gespült und der markierte Sekundärantikörper (30 min; 50 µl; R.T.U.; ImmPRESS Universal Reagent Anti-Mouse/ Rabbit-Peroxidase) pipettiert. Im Anschluss noch einmal spülen mit PBS und das Substratkit für Peroxidase (LinRED bzw. GREEN) zugeben. Das Substratkit enthält Wasserstoffperoxid in einem stabilisierten Puffer. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei RT und lichtgeschützt. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt. Hinterher konnten die Zellpräparate lichtmikroskopisch auf Positivität mit dem Lichtmikroskop Axiovert 40C (Fa. Zeiss) beurteilt werden. Falls eine Gegenfärbung erwünscht war, wurde diese mit wässrigem Hämalaun (2 min, Fa. Sigma Aldrich) durchgeführt. Die Farbentwicklung der Gegenfärbung entfaltete sich unter fließendem Wasser⁷⁵.

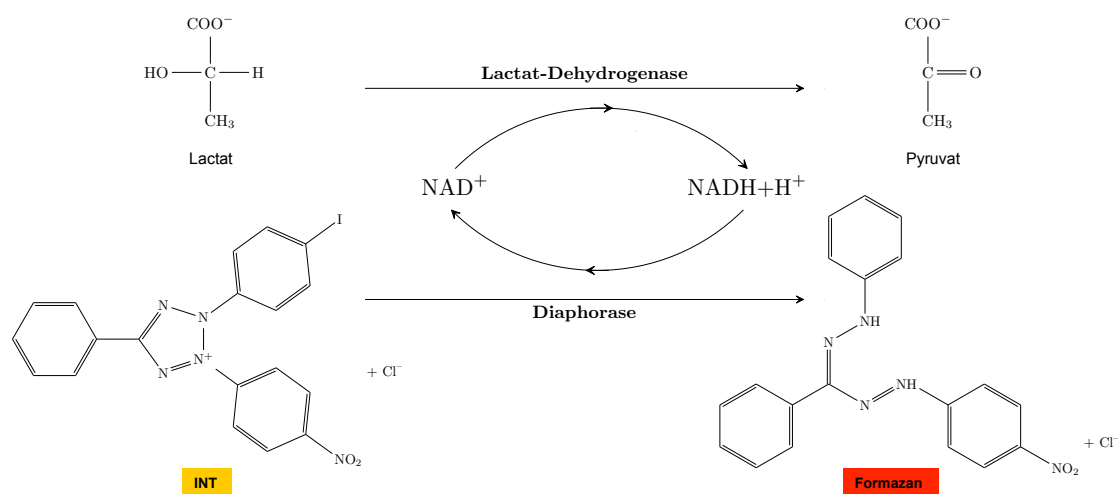
Zellproliferation, mitochondriale Vitalität und Zytotoxizität

Jeder chemische Stoff gilt als zytotoxisch (Arzneistoffe, Antikörper, Viren, Biomaterialien), wenn dieser schädigend auf Zellen bzw. Gewebe wirkt. Die Bestimmung der

Zytotoxizität ist ein wichtiger Part der Prüfung auf Biokompatibilität von Stoffen oder Materialien. Hierfür stehen zahlreiche *in-vitro* Methoden zur Verfügung.

Die Zellproliferation, mitochondriale Vitalität und Zytotoxizität der Fibroblasten während des Netzkontaktes wurden mit Hilfe des BrdU-Zellproliferations- und MTT-Vitalitätstests sowie mit dem LDH-Zytotoxizitätstest von der Fa. Roche quantitativ geprüft. Für alle drei Tests waren die Vorbereitungen identisch. Für diese Untersuchungen eignete sich die 96Well-Zellkulturplatte mit planem Boden (Fa. Biochrom AG). Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml entsprechend vorher durchgeführter Testungen vorgelegt. Als Suspensionsmittel diente das Fibroblastmedium 2 (Fa. PromoCell). Pro Well kamen 100 µl Zellsuspension zum Einsatz. Ein Adhären der Zellen gelang innerhalb 24 h im Inkubator unter physiologischen Bedingungen (37°C; 5 % CO₂; wasserdampfgesättigter Atmosphäre). Für alle Ansätze galt stets eine Vierfachbestimmung. Jeder Versuchsansatz wurde mindestens dreimal wiederholt. Bei allen Tests wurden auf jeder 96Well-Platte mindestens zwei Kontrollen mitgeführt. Die Blindkontrolle (Negativkontrolle 1) bestand aus dem nativen Nährmedium und die Kontrolle 2 setzte sich aus den Zellen und dem Fibroblastmedium zusammen. Der Messwert der Blindkontrolle (Negativkontrolle 1) wird von allen anderen Messwerten subtrahiert. Die Größe der Netzstücke (5 mm × 5 mm) wurde an die Reservoirs der 96 Well-Platten angepasst.

LDH- Test Der LDH-Test (Fa. Roche) ist ein quantitativer Assay, mit dem photometrisch die Enzymaktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) gemessen wird, die von toten Zellen in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde. Der Vorteil gegenüber anderen Testverfahren ist, dass hier ohne Radioaktivität gearbeitet wird⁵⁹. Lactat-Dehydrogenase entsteht bei der Oxidation von Lactat zu Pyruvat und bei gleichzeitigem Ablauf der Re-

Abbildung 3.6: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstests^{51;61;101}.

duktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$. Durch eine zweite Enzymreaktion wird die Enzymaktivität gemessen. Das Enzym Diaphorase und Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) wurde zum Zellkulturüberstand pipettiert. Die Diaphorase beeinflusst die Reduktion des gelben INT, dass daraus rotes Formazan-salz entsteht, während gleichzeitig $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert wird (Abbildung 3.6). Am ELISA-Plattenreader (Fa. BioRad GmbH) erfolgte die Konzentrationsmessung des Formazans, welches proportional zur LDH-Aktivität im Überstand ist und mit der Anzahl toter Zellen korreliert^{51;61;98}.

Nach dem Adhären der Zellen (24 h) wurde das verbrauchte Fibroblastmedium (supplementhaltig) durch frisches Medium (mit 1 % FKS, aufgrund der LDH-Aktivität des FKS) ersetzt. Zur Bestimmung der Zytotoxizität war noch eine 3. Kontrolle erforderlich. Die sogenannte High control (Medium + Zellen + 1 % Triton) gibt Aufschluss über die maximale LDH-Aktivität in den Zellen. Durch Zugabe von Triton wurden die Zellen 100 %ig zerstört und das LDH wurde aus den Zellen abgegeben. Nach weiterer Inkubation (24 h) der Proben, einschließlich Kontrollen, und nach Zugabe der Testsub-

stanz aus dem LDH- Kit (100 µl) inkubierte der Ansatz zwecks Farbentwicklung 15 min im Dunkeln bei RT. Bevor die LDH-Aktivität am Plattenreader (Fa. BioRad GmbH) gemessen werden konnte, musste die Reaktion mit 1 N HCl (50 µl) gestoppt werden. Im Anschluss erfolgte die Berechnung der Zytotoxizität in [%] (siehe Gleichung (3.2)).

$$\text{Zytotoxizität} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Zellen+Medium+Netz}} - \text{Extinktion}_{\text{Zellen+Medium}}}{\text{Extinktion}_{\text{HighControl}} - \text{Extinktion}_{\text{Zellen+Medium}}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Tabelle 3.2: Ansatz für LDH-Bestimmung (ELISA, Fa. Roche)⁹⁸.

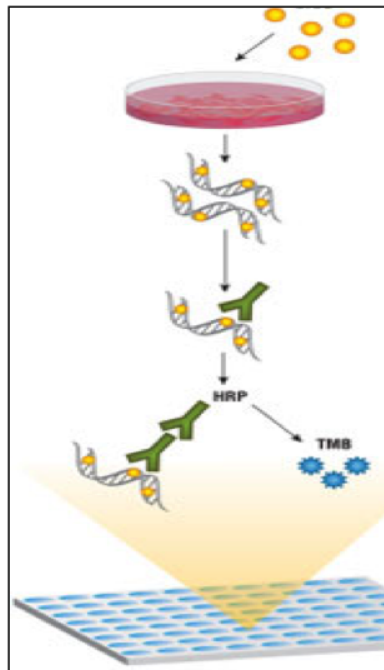
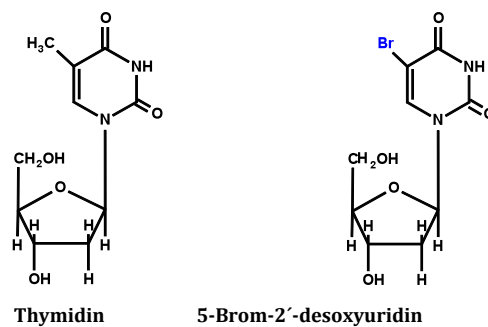
1. Schritt	Zellkultivierung: 100 µl/Well in 96 Well-Platte + Netz 24 h
2. Schritt	Mediumwechsel: Nährmedium (Suppl.) → Nährmedium (1 % FKS) 24 h
3. Schritt	100 µl Überstand in eine neue 96 Well-Platte überführen
4. Schritt	+100 µl/Well Reaction mixture auf Überstand (im Dunklen, RT) 15 min
5. Schritt	Abstoppen mit 50 µl 1 N HCl/Well
6. Schritt	Messung am ELISA-Reader bei 492 nm und Referenz 620 nm

BrdU (5-bromo-2-deoxy-uridine) -Test und ELISA-Prinzip (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Der BrdU-Zellproliferationstest ist ein kolorimetrischer Immunoassay. Er basiert auf den Einbau von BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) in die DNA an Stelle von Thymidin (Abbildung 3.7). Nach Kultivierung der Zellen und Kontakt mit den unterschiedlichen Biomaterialien wurde das Thymidinanalogon BrdU zu den Zellen gegeben. In der darauf folgenden Inkubationszeit baute die DNA-Polymerase der Zellen das BrdU während der Replikation in die DNA ein. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Es wurde ein BrdU-Antikörper hinzugegeben, dessen Bindung an BrdU durch die Denaturierung der DNA erleichtert wird. Dieser Antikörper bindet an das BrdU der neusynthetisierten zellulären DNA. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Antikörper von Maus-Maus-Hybridzellen, konjugiert mit einer Peroxidase. Der Immunkomplex wurde mittels einer Substratreaktion mit Farbumschlag gemessen (Abbildung 3.8). Hier handelte es sich bei dem Substrat um TMB (Tetramethylbenzidin). Die Absorptionsmessung des Reaktionsproduktes gelang bei entsprechender Wellenlänge am ELISA-Reader (Fa. BioRad GmbH). Die Stärke der Reaktion bzw. die Höhe der Extinktionen und die daraus resultierende Absorption korrelieren mit der Menge neu synthetisierter DNA und dementsprechend mit der Anzahl proliferierender Zellen⁹⁸.

$$Zellproliferation = \left(\frac{Extinktion_{Zellen+Medium+Netz}}{Extinktion_{Zellen+Medium}} \cdot Extinktion_{Medium} \right) \cdot 100 \quad (3.3)$$

Die Zellen für die Aussaat standen über einen Zeitraum von 48 h mit den Netzmaterialien in Kontakt. Zusätzlich war hier auch eine 3. Kontrolle, welche Informationen über die unspezifische Bindung von BrdU und anti-BrdU-POD an die Mikrotiterplatte

Abbildung 3.7: Einzelne Arbeitsschritte des BrdU-Tests^{40;100}Abbildung 3.8: Prinzip des BrdU-Tests: Einbau von BrdU anstelle von Thyminidin in die DNA^{98;101}.

liefert, nötig. Ebenfalls musste eine Background-Kontrolle, welche Hinweise über die unspezifische Bindung von Anti-BrdU-POD an die Zellen in Abwesenheit von BrdU aufzeigt, mitgeführt werden⁹⁸.

Tabelle 3.3: Ansatz für BrdU-Bestimmung (ELISA, Fa. Roche)⁹⁸.

1. Schritt	Zellkultivierung: 100 µl/Well in 96 Well-Platte (Netzproben + Kontrollen), 24 h Inkubation: 37°C, 5 % CO ₂
2. Schritt	Markierung mit 10 µl/Well BrdU 4 h → Entfernung des Mediums und der Biomaterialien
3. Schritt	200 µl FixDenat/Well 0,5 h RT → Entfernung des FixDenat, 3x Waschpuffer dekantieren
4. Schritt	100 µl/Well Anti-BrdU-POD working solution 1 h → Anschließend Entfernung der Anti-BrdU-POD working solution
5. Schritt	100 µl/Well Substratlösung (im Dunklen, RT) 15 min (Farbentwicklung beachten)
6. Schritt	Abstoppen mit 25 µl 1 M H ₂ SO ₄ /Well
7. Schritt	Messung am ELISA-Reader bei 450 nm und Referenz 620 nm

MTT (Methylthiazoltetrazoliumbromid)-Test Die wachstumsfördernde Wirkung während des Ansatzes wurde mit dem Proliferation/Vitalitäts-Kit (MTT-Test) getestet. Dabei handelt es sich ebenfalls um einen biochemischen Assay von der Fa. Roche mit dem die Proliferation und die Zellvitalität metabolisch aktiver Zellen kolorimetrisch gemessen werden. Für diesen chemischen Vorgang werden mitochondriale Dehydrogenasen benötigt. Diese Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv. Deshalb kann die Umwandlung von MTT zu Formazan als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen

werden⁹⁸(siehe Gleichung (3.4)).

$$Zellviabilitaet[\%] = \frac{Extinktion_{Zellen+Medium+Netz} - Extinktion_{Medium}}{Extinktion_{Zellen+Medium} - Extinktion_{Medium}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Dieser nichtradioaktive Test basiert auf der Spaltung von gelbem Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) in einen violetten Formazan-Farbstoff (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Prinzip des MTT-Tests^{98;101}.

Für die einzelnen Ansätze wurde folgendes Protokoll verwendet (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Ansatz für MTT-Test ELISA, Fa. Roche)⁹⁸.

1. Schritt	Zellen + Netz + Medium; Kontrollen inkubieren 24 h
2. Schritt	Mediumwechsel, einschließlich Entfernung der Netze
3. Schritt	+10 µl/Well MTT-Reagenz → physiologische Inkubation 4 h
4. Schritt	+100 µl/Well Solubilisierungslösung → physiol. Inkubation über Nacht
5. Schritt	Messung am Platten-Reader bei 570 nm

Quantitative Analyse des programmierten Zelltodes mit der Durchflusszytometrie Dieses Untersuchungsverfahren stützt sich auf der Fluoreszenz von Zellen. Sie beruht auf der Messung der DNA in den Zellen. Ihr Prinzip ist das simultane Messen verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzelebene^{46;59;73;75;105}.

Die Fibroblasten wurden zusammen mit den Netzstücken ausgesät und unter physiologischen Bedingungen im Inkubator für 48 h gehalten. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte das Dekantieren des verbrauchten Mediums. Anschließend schloss sich eine 3malige Spülung der Zellen mit PBS an. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Well-Platte und aus den Netzen abgelöst, in FACS-Röhrchen überführt, noch einmal mit PBS gewaschen und 8 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FACS-PBS aufgenommen. Innerhalb von 24 h erfolgten die Analysen bei einem hinzugezogenen Kooperationspartner der Universitätsmedizin Rostock (Klinische Forschung, KIM). Dafür wurden die Zellen mit 1 mg/ml RNase 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 50 µg/ml Propidiumjodid versetzt, 3 h auf Eis gestellt und dann am BD FACSCalibur gemessen. Mit dem CellQuest Pro 4.01. gelang die Datenerfassung und mit dem ModFIT LT 3.0 für Power Mac die Berechnung der Ergebnisse.

Quantifizierung des Wachstums der Zellen in die Netzmaschen Eine Quantifizierung des Zellwachstums erfolgte mit der Real-Time-PCR²¹. Zuvor wurden durch einen Trypsinierungsvorgang die Fibroblasten aus den Biomaterialien gelöst. Bei dem molekularbiologischen Testverfahren wurde aus den trypsinierten Fibroblasten zunächst die RNA präpariert. Im Anschluss gelang mit der Reversen Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) das Umschreiben in cDNA. Die Quantifizierung erfolgte im iCycler (Fa. Bio-

Rad). Als Standard standen zwei Primer, das β -ActinF und β -ActinR, von der Fa. Invitrogen zur Verfügung.

Durchführung:

1. Ablösen der Zellen von der Zellkulturplatte und aus den Netzmaschen

Bei der Quantifizierung des Zellwachstums erfolgte als erster Schritt der Trypsinierungsvorgang. Dieser Vorgang wurde bereits o. g. im Abschnitt 3.2.1 abgehandelt.

2. RNA-Extraktion

Unter Verwendung des RNeasy Mini Kit® (Fa. Qiagen) gelang die Isolierung der einzelsträngigen RNA nach Herstellerangaben. Dazu wurden zunächst die trypsinierten Zellen mittels Lyse-Puffer (10 μ l Mercaptoethanol auf 1 ml RLT Buffer) gelöst und mit dem Vortexer homogenisiert (1 min/Probe). Anschließend wurden die Proben mit 350 μ l 70 %igem Ethanol (700 μ l pro Tube) versetzt und in die vorgegebenen spin columns (im Kit enthalten) überführt. Es schloß sich eine Zentrifugation mit der Kühlzentrifuge Eppendorf 5402 (15 s; 10.000 U/min) an. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, konnten 700 μ l Puffer RW1 (im Kit enthalten) auf die Säule pipettiert werden. Darauf folgte wiederum eine Zentrifugation und im Anschluss die Entfernung des Filtrates. Danach 2maliges Waschen der Säule mit dem im Kit enthaltenem RPE-Puffer (500 μ l) und zentrifugieren 1x 15 s und 10.000 rpm und das zweite Mal 2 min bei 12-15.000 U/min. Nach Lufttrocknung der Membran (1 min) wurde das Collection-Tube durch ein Eppendorf-Tube ersetzt und es folgte das Waschen mit 50 μ l RNase-freiem Wasser (DEPC behandeltes Wasser). Nach nochmaligem Zentrifugieren (1 min bei 10.000 U/min) wur-

de das RNA-Pellet 1:5 mit DEPC-H₂O verdünnt.

Messung der RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Spectrometer (Pharmacia Biotech) über die Messung der optischen Dichte, bei einer Absorption von 260 nm. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen von 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der RNA durch Bildung des Quotienten kontrolliert werden. Als Leerwert-Kontrolle dienten 20 µl DEPC-behandeltes Aqua dest. Die einzelnen RNA-Konzentrationen wurden nach folgender Gleichung berechnet (siehe Gleichung (3.5)).

$$RNA [\mu l] = \frac{Endkonzentration [ng/\mu l] \cdot Endvolumen [\mu l]}{Ausgangskonzentration [ng/\mu l]} \quad (3.5)$$

Nach der Messung erfolgte die Einstellung der isolierten RNA auf 20 ng/µl. Danach wurden die definierten Proben sofort am iCycler (Fa. BioRad GmbH) quantifiziert oder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung zwischengelagert.

3. Reverse Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion)

Mit der RT-Reaktion, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, gelang es die einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA umzuschreiben. In Tabelle 3.5 ist das Pipettierschema vorgelegt. Die Negativkontrolle erfolgte mit Aqua dest. (13 µl) anstelle von RNA.

Tabelle 3.5: Pipettierschema des RT-Mastermix + RNA; Gesamtvolumen/Ansatz = 22 µl.

Volumen [µl]	Enzyme/Reagenzien
13	10 µl RNA der Probe (0,1 µg - 0,3 µg RNA + DEPC-Wasser) + 3 µl Random Primer oder oligo dT (Hexanucleotide [50 ng/µl])
4	Stand-Buffer (5xT-Buffer)
2	0,1 M DTT
1	Ribo-Inhibitor (RNasin, 5 Units/µl) = RNase-Inhibitor
1	dNTP's Nucleotide Mix (Desoxynucleosidtriphosphate) [10 mM]
1	Superscript 2 (RT)

Tabelle 3.6: Inkubationszeiten für RT-Reaktion.

Arbeitsschritte	Temp. [°C]	Zeit [min]
RNA-Proben	RT	10
	42	50
	5	95
	auf Eis	3
Proben anzentrifugieren	RT	1
Proben mit DEPC-H ₂ O auf 55 µl auffüllen	-20	∞

4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch Mullis et al.⁶⁶ wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen aus geringen Mengen DNA mit hoher Ausbeute zu amplifizieren. Eine Weiterentwicklung dieser fand 1988 durch die Entdeckung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Archeabakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) statt⁷. Insgesamt sind drei Teilschritte notwendig, die sich beliebig häufig wiederholen lassen²¹.

- a) Melting (Denaturierung oder Schmelzen)
- b) Annealing (Primerhybridisierung)
- c) Elongation (Polymerisation, Verlängerung)

Für die Quantifizierung am iCycler wurden 342 bp (oligo dT Fragmente) benötigt, die kommerziell erworben wurden. Pro Probe lag ein Gesamtansatz von 25 µl vor.

Tabelle 3.7: Pipettierschema für einen standardisierten PCR-Reaktionsansatz.

Volumen [µl]	Enzyme/Reagenzien im PCR-Mix
4	cDNA (1:5 verdünnt)
12,5	SYBR Green
1	Primer 1 β -Actin (1:10 verdünnt)
1	Primer 2 β -Actin R (1:10 verdünnt)
6,5	H ₂ O dest.

Der T_m -Wert ist abhängig von Länge und Sequenz des Primers. Die Schmelztemperatur konnte nach der Wallace-Regel errechnet werden:

$$T_m = 2 \cdot (A + T) + 4 \cdot (C + G) [t_m = 69 + 0,41 + GC\% - 650L] \quad (3.6)$$

Tabelle 3.8: Temperatur- und Zeitvorgaben im Thermocycler; Σ 40 Zyklen.

Phase	Temp. [°C]	Zeit [min]
Aktivierung der Taq Polymerase	94	4
Melting	94	0,5
Annealing	62	0,5
Synthese	72	1
Elongation	72	10
Reaktionsende	4	∞

Morphologische Verlaufsanalysen

Lichtmikroskopie Die Lichtmikroskopie dient zur routinemäßigen Kontrolle der Zellkulturen. Durch diese Methode ist es möglich, ständig Aussagen über den Zustand, wie z. B. Zelldichte, der kultivierten Zellen zu geben. Mit diesem Verfahren gelang auch das Ausschließen einer eventuellen Zellkontamination. Die Nutzung der Lichtmikroskopie, als semiquantitatives Auswertungsverfahren, gab Aufschluss über das Morphologieverhalten der Zellen (Differenzierungsgrad). Gleichzeitig konnte der Zellbewuchs in die Implantate kontinuierlich bildlich festgehalten werden. Fibroblasten weisen eine spindelförmige Morphologie auf und sind mit ihren irregulären zytoplasmatischen Fortsätzen miteinander verbunden. Es sind langgestreckte Zellen, deren Zellkerne sehr gut sichtbar sind³⁷.

Fibroblasten (Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml) wurden mit den Netzmaterialien (10 mm \times 10 mm) auf einer 24Well-Platte wie o. g. unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 12 Wochen. Mehrmals wöchentlich fand ein Mediumwechsel statt, sowie wöchentlich eine morphologische Analyse mit dem Lichtmikroskop (Axiovert 40C; Fa. Zeiss®). Durch Nutzung der Phasenkontrastmikroskopie

entstanden ohne Fixierung und Färbung gute Entwicklungs- und Adhärenzbilder⁵.

Rasterelektronenmikroskopie (REM) In Kooperation mit dem Institut für Pathologie im EMZ der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock) konnten rasterelektronenmikroskopische Bildanalysen erstellt werden. Für die Untersuchungen stand das Elektronenmikroskop DSM 960A (Fa. Zeiss®) zur Verfügung. Dieses Elektronenmikroskop verfügt über ein Auflösungsvermögen von 4 nm und eine max. 100.000x Vergrößerung.

Das REM dient zur Oberflächenstrukturanalyse und ist eine qualitative Auswertung. Bei dieser Methode wird ein sehr feingebündelter Elektronenstrahl über die Objektoberfläche gefahren. Die dabei entstehenden Wechselwirkungsprodukte (Röntgenstrahlen, Sekundärelektronen, etc.) werden zur Bilddarstellung genutzt. Mit dem REM entstehen Bilder mit sehr hoher Auflösung [nm] und mit sehr hoher Schärfe (1.000x größer als am Lichtmikroskop). Die Bilddarstellung ist immer schwarz/weiß^{74;89}.

Der Zellansatz mit den Biomaterialien ist identisch mit dem Ansatz der lichtmikroskopischen Untersuchung. Allerdings wurde erst nach Versuchsablauf (12 Wochen Inkubation) weiter verfahren, d. h. es handelt sich um Endpunktbestimmungen. Dazu musste das verbrauchte Medium dekantiert und mit 4 %igem gepuffertem Glutaraldehyd (pH 7,2-7,4) fixiert werden. Danach wurden die Präparate im EMZ mehreren Wasch- und Trocknungsschritten unterzogen. Anschließend erfolgte das Aufbringen der Netzmaterialien auf einen Al-Probenträger. Mittels einer Goldelektrode gelang das Benetzen der Netze mit Goldpartikeln. Daraufhin war die Visualisierung am Rasterelektronenmikroskop möglich. Beurteilt wurde visuell die Adhärenz der Zellen in den Maschen⁵⁵.

Energiedispersive - Röntgen - Mikrobereichsanalyse (EDX) Diese Testmethode zählt zur Röntgenspektroskopie. Mit Hilfe des EDX-Verfahrens ist es möglich, die in einer Probe vorkommenden Elemente qualitativ und quantitativ nachzuweisen¹.

Die Atome der zu untersuchenden Proben werden durch einen Elektronenstrahl angeregt. Bei der Anregung springt ein Elektron aus einem inneren Orbital des Atoms. Dabei entsteht ein instabiler Zustand, der damit aufgehoben wird, dass ein Elektron aus dem nächsthöheren Atomorbital zurück in das tiefer gelegene fällt. Hierbei treten Energiedifferenzen auf, die als Quanta gemessen werden. Diese Röntgenstrahlung ist für jedes einzelne Element charakteristisch (Abbildung 3.10). Deshalb kann eine EDX-Analyse Aufschluss über die Stoffzusammensetzung der Netzproben geben^{25;32}.

An allen verwendeten Materialien gelang am Rasterelektronenmikroskop eine EDX-Analyse. Die Messungen erfolgten im Institut für Pathologie, EMZ, Universitätsmedizin Rostock.

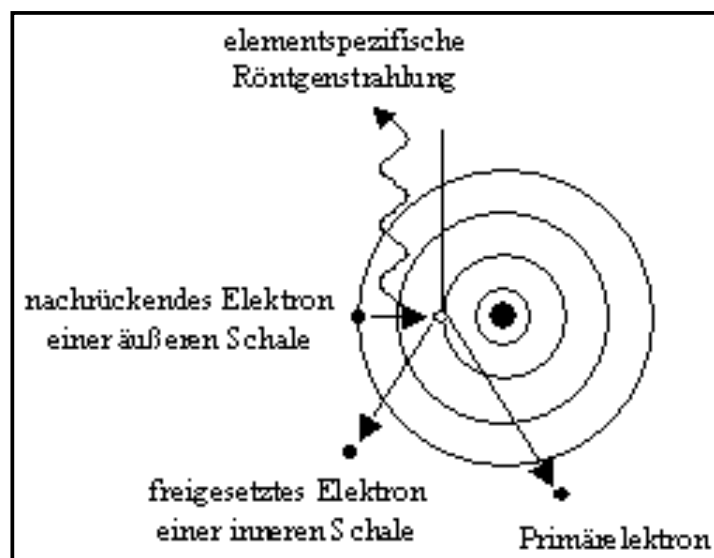


Abbildung 3.10: Arbeitsprinzip EDX-Verfahren¹.

Bestimmung von physiologischen und pharmakodynamischen Effekten

Die Bestimmung von physiologischen Effekten mit Biomaterialien an humanen Fibroblasten war ebenfalls Inhalt dieser Arbeit. Es handelte sich dabei um eine Dienstleistung der Fa. Bionas GmbH (Rostock - Warnemünde, Deutschland). Die Prüfung beinhaltete die Untersuchung der metabolischen Beeinflussung durch Biomaterial-Mediumextrakte auf Fibroblasten. Getestet wurden 5 verschiedene Netzmaterialfäden von der Firma SE-RAG WIESSNER GmbH & Co. KG [Silberfaden (PP/Ag); Proflex-Faden (PP/PGACL), Serafast/Monofast-Faden (PGACL); Serapren-Faden (PP); Seralene-Faden (PVDF)]. Zunächst wurde das jeweilige Fadenmaterial (10 m) steril in Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und mit DMEM-Medium ohne FKS und mit Phenolrot versetzt (Abbildung 3.8). Die Negativkontrolle bestand aus reinem DMEM-Medium. Es folgte eine Inkubation über einen Zeitraum von 4 Wochen bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Nach der Inkubationszeit diente das jeweilige Medium als Mediumextrakt. Zuvor musste das Biomaterial steril entnommen werden. Wie in der Abbildung 3.11 ersichtlich kam es zu erheblichen pH-Wertänderungen in einigen Proben. Das Phenolrot im Medium gilt in der Chemie als Indikator. Das Medium hat vor Gebrauch einen pH-Wert von 7,20-7,40 und eine rötliche Farbe. Verfärbt sich das Medium, hat eine pH-Wertänderung stattgefunden. Wird es gelblich, ändert sich der pH-Wert zum sauren Bereich. In dem Versuchsansatz war diese Farbumwandlung deutlich in einer Probe zu beobachten (Abbildung 3.11). Es war ein Farbumschlag von rot nach gelb zu erkennen. Der Faden dieser Probe war resorbierbar (Glycolsäure). Aber auch in den Fadenproben, die als Bestandteil PGACL (resorbierbar) enthielten, kam es zur pH-Wert-Änderungen. Jedoch war der Farbumschlag nicht so ausgeprägt wie bei der vorher erwähnten Probe.

Die Messung der Teste und deren computergesteuerte Auswertung erfolgte mittels

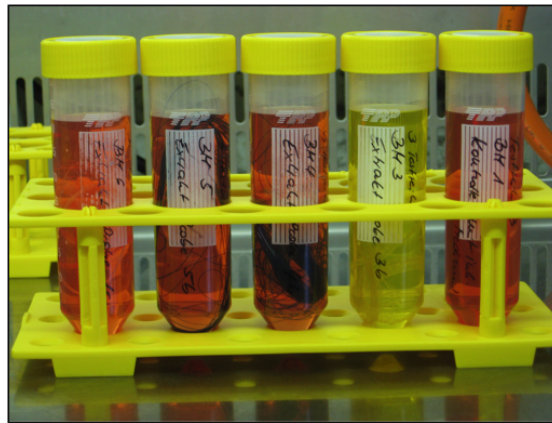


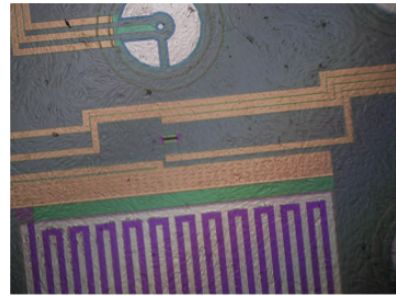
Abbildung 3.11: Nahtmaterial steril in Zentrifugenröhrchen.

des Bionas 2500® analyzing system. Dafür mussten die Zellen auf einen Sensorchip (Abbildung 3.12 a und b) gebracht werden ($7 \cdot 10^4$ Zellen/ml). Um ein vollständiges Adhärieren der Zellen auf den Chips zu gewährleisten, wurden diese mit Fibronektin vorbehandelt. Die Sensorchips sind von der Fa. Bionas GmbH (Rostock) in Zusammenarbeit mit dem Halbleiterhersteller Micro (Freiburg) entwickelt worden.

Zur Analyse der Atmungs-, Ansäuerungs- und Adhäsionsmessungen wurde die Rate [%] in Abhängigkeit zur Zeit [h] aufgetragen (Abbildung 4.29 bis Abbildung 4.31). In den ersten 5 h bekamen die Fibroblasten zunächst DMEM mit FKS-Zusatz. Dieser als Anpassungs- bzw. Prophase bezeichnete Messabschnitt geht dem eigentlichen 24-stündigen Messzeitraum voraus. In den 24 h andauernden Messzeitraum wird ein Mediumwechsel zum Mediumextrakt durchgeführt. Abschließend wird nach dem Messzeitraum wieder auf DMEM mit FKS-Zusatz umgestellt. Dieser Schritt zeigt inwieweit die sich veränderten Messergebnisse reversibel sind. Als Referenz wird ein Zell-Chip zusätzlich mit 19 mM Phenol versetzt. Bei dieser Konzentration liegt nach 24 h eine IC₅₀ vor.



(a) Sensorchip



(b) Zellbewuchs



(c) Analysesystem

Abbildung 3.12: Sensorchip und Bionas 2500® analyzing system¹¹¹.

Auf den Chips sind 3 Sensoren eingearbeitet:

1. Sauerstoffsensoren (Clarkensoren)
2. Ansäuerungssensoren (ISFET = ionensensitiver Feldeffekttransistor)
3. Adhäsionssensoren (IDES-Sensor Interdigitated Electrode Structure)

Sechs Sensorchips konnten parallel gemessen werden. Die Durchflussrate betrug 56 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Messungen fanden in einer Inkubationskammer (37°C) statt^{105;111}.

Mit dem Bionas 2500® analyzing system (Abbildung 3.12) gelang es, folgende metabolisch relevante Parameter zu messen.

1. Impedanz
2. Ansäuerungsrate
3. Sauerstoffverbrauch von Testzellen

ImageJ (Bildverarbeitungsprogramm)

Für die Ermittlung des prozentualen Bewuchses der Netze mit Fibroblasten, konnte das ImageJ, ein Bildverarbeitungsprogramm, genutzt werden. Dabei handelt es sich um ein Programm, welches auf der Computersprache Java basiert und somit plattformunabhängig ist. Vom National Institute of Health entwickelt, wird es heute vielfach in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Bildanalyse benutzt.

Statistik

Die Untersuchungen zur Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität mittels BrdU-, MTT- und LDH-Test wurden insgesamt dreimal wiederholt. Pro Ansatz erfolgten jeweils Vierfachbestimmungen. Aus den Einzelwerten konnten zunächst die Mittelwerte gebildet und dann die Standardabweichungen errechnet werden. Der Mittelwert der Negativkontrolle 2, bestehend aus Zellsuspension, musste für die Darstellung der Zellproliferation (BrdU-Test) und der Vitalität (MTT-Test) auf 100 % gesetzt werden.

Alle messbaren Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit dem Programm Excel der Student's t-Test überprüft. Die Signifikanz der Werte wurden mit $p < 0,05$ (*; signifikant), $p < 0,005$ (**; hoch signifikant) und $p < 0,0005$ (***; höchst signifikant) festgelegt.

4 Ergebnisse

Zuerst werden die Ergebnisse zum Metabolismus der Zelle dargestellt. Anschließend folgen die qualitativen Auswertungen der Immunhistochemie und die Analysen der Zytotoxizitäts-, Proliferations- und Vitalitätsuntersuchungen. Danach sind die quantitativen Messungen des programmierten Zelltodes (FACS-Analyse) dargelegt. Es folgen die qualitativen Auswertungen mit dem Licht- und dem Rasterelektronenmikroskop, sowie die Dokumentation der EDX-Analysen. Im Anschluss sind die Abbildungen der prozentualen Resultate des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ und die Quantifizierung der Adhärenz mit dem iCycler abgebildet. Als nächstes werden die Bestimmungen von physiologischen und pharmakodynamischen Effekten am Bionas 2500® analyzing system aufgezeigt.

Abschließend ergab sich die Möglichkeit, Explantate aus der urogynäkologischen Praxis zu untersuchen. Die zur Verfügung stehenden Präparate wurden licht- und rasterelektronenmikroskopisch und histologisch aufgearbeitet. Die daraus hervorgehenden Resultate wurden mit den *in-vitro* Ergebnissen in bezug gestellt.

Die graphischen Darstellungen sind farblich unterlegt, um eine optimale Zuordnung in resorbierbare, teilresorbierbare und nicht resorbierbare Materialien mit und ohne Beschichtung zu ermöglichen. Im Folgenden wird dieses Farbschema verwendet:

- grau = reines Medium

- violett = Medium + Zellen
- rot = resorbierbar
- blau = nicht resorbierbar
- braun = nicht resorbierbar + Titanbeschichtung
- grün = teilresorbierbar
- gelb = nicht resorbierbar + Silberbeschichtung

4.1 Metabolische Untersuchungen

Vitalitätstestungen

Vor jedem Testansatz erfolgte eine Vitalitätsprüfung durch Zellzählung. Mit der Bürker-Zählkammer und unter Verwendung von Trypanblau konnte die Lebendzahl bestimmt werden. Die genutzten Zellen wiesen regelmäßig in den Versuchen eine Vitalität $\geq 95\%$ auf. Die Zelldichte nahm in jedem Probenansatz zu, jedoch mit unterschiedlicher Konzentration (mindestens um das 10fache).

pH-Wert-Analyse

In der folgenden Graphik (Abbildung 4.1) wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen von den pH-Wert-Analysen dargestellt, beginnend mit dem absoluten Medium und mit dem pH-Wert aus Medium + Zellen. Die resorbierbaren Materialien (Vypro® und Pelvi Soft) zeigten einen Abfall des pH-Wertes. Es kam bei den Ansätzen zu einer Ansäuerung im Inkubationsmedium, was auch verständlich war. Diese beiden Netze zerfielen während des Ansatzes zunächst in Bruchstücke (Abbildung 4.2)

und später war lichtmikroskopisch eine Resorption der Netzmaterialien zu beobachten. Bestandteil der resorbierbaren Netze war das Kollagen, welches letztendlich als Milchsäure physiologisch abgebaut wurde. Dabei entstanden die sauren pH-Werte. Die pH-Wertänderung betrug $\geq 0,2$ (von 7,45 auf 7,20). Bei den teilresorbierbaren Materialien (Pelvitex, Ultrapro und Vypro II) verschoben sich die pH-Werte aus demselben Grund. In den Netzvarianten (nicht resorbierbare und beschichtete) erhöhte sich der pH-Wert nur gering ($\leq 0,06$). Diese geringen Veränderungen sprechen für eine gute Funktionalität der Zellen während des Kontaktes mit den Kunststoffnetzen.

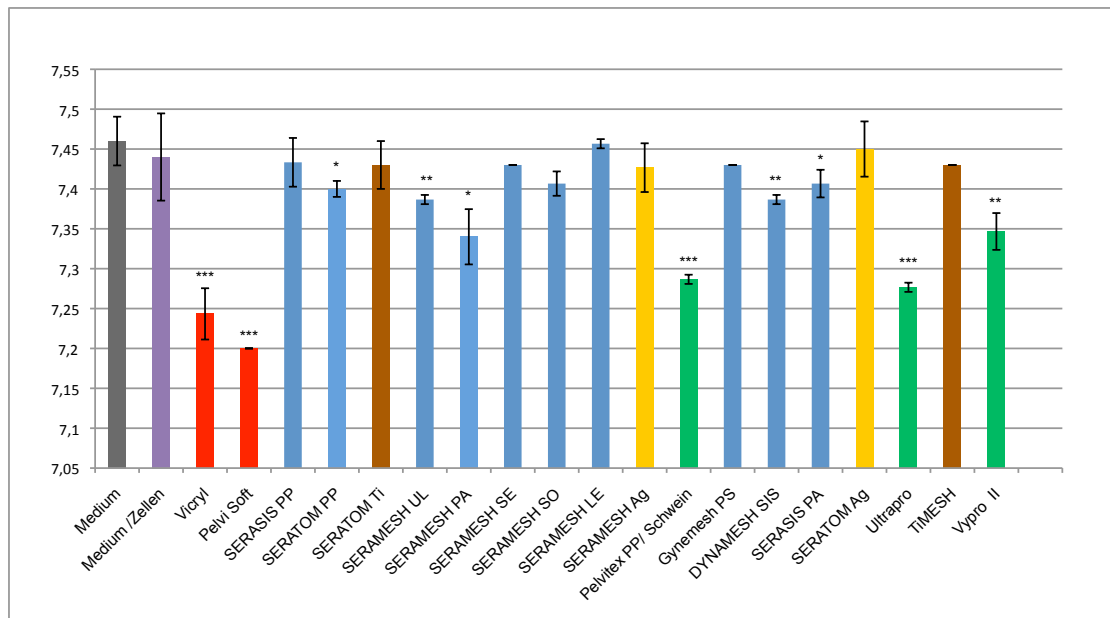


Abbildung 4.1: Metabolismus der Zelle: pH-Wertänderungen; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum reinen Medium und zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$) bezogen auf Medium + Fibroblasten.

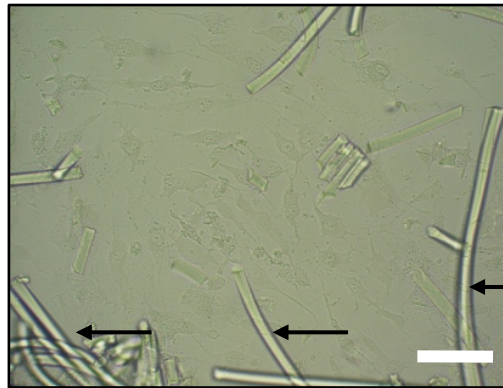


Abbildung 4.2: Lichtmikroskopische Darstellung: Bruchstücke eines resorbierbaren Netzes nach 12wöchiger Inkubation; weißer Skalierungsbalken = 250 μm .

Glukosebestimmungen in den Zellkulturüberständen

In allen Ansätzen wurde zur Überprüfung des Zellmetabolismus die Zellglykolyse überprüft. In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse graphisch aufgezeichnet. Auch hier wurde zwischen resorbierbaren, teilresorbierbaren und nicht resorbierbaren Netzen mit und ohne Beschichtung unterschieden.

Im Ergebnis stand fest, dass alle genutzten Netzmaterialien zur Abnahme der Glukosewerte führten. Allerdings zeigte der Glukosestoffwechsel der Zellen einen differenzierten Abfall. Bezugnehmend auf die Resorbierbarkeit der Stoffe gab es keine Tendenz. Die Regression der Glukosewerte deutete auf eine gute Glykolyse der Fibroblasten bei Netzkontakt hin, d. h. die Zellen führten während der Interaktion einen guten Stoffwechsel durch und wurden nicht von den Kunststoffen beeinflusst.

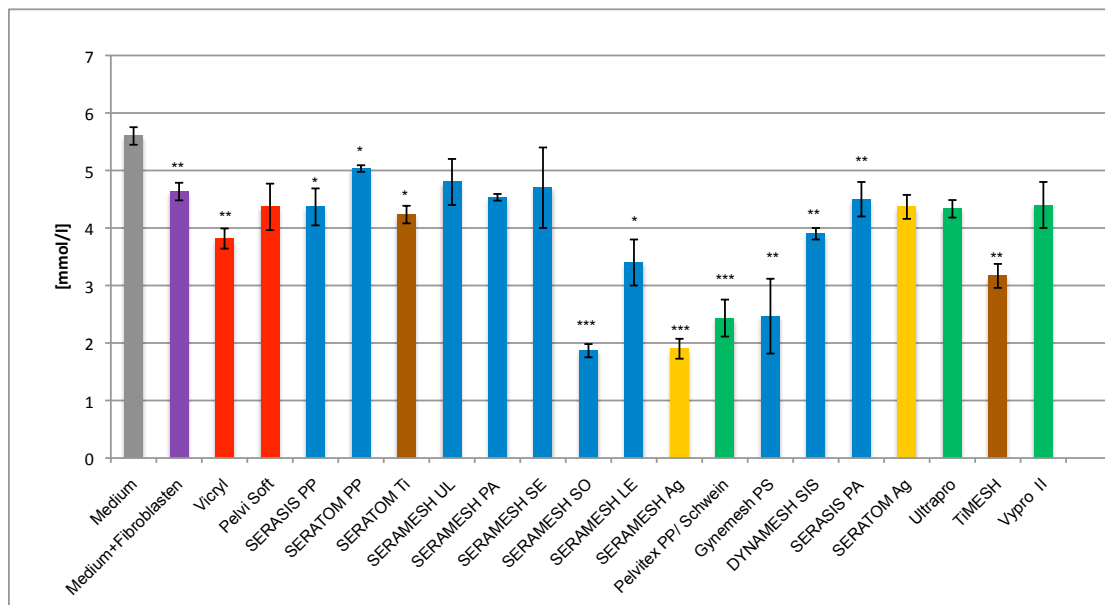


Abbildung 4.3: Metabolismus der Zelle: Glukoseanalysen; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum reinen Medium und zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Auswertung des oxidativen Stresses

Zur Überprüfung des Metabolismus der Zellen konnte der Nachweis des oxidativen Stresses in den Zellen während des Netzkontaktes herangezogen werden. Es wurde der oxidative Stress im Medium von Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum Medium + Fibroblasten bestimmt. In Abbildung 4.4 sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*; **; ***) bezogen auf Medium + Fibroblasten beschrieben. Die Ergebnisse des oxidativen Stresses während der Inkubation mit den unterschiedlichen Materialien zeigten keinen pathologischen Befund. In keiner Messung wurde der Normbereich überschritten.

Fazit Die Ergebnisse der Glykolyse, die pH-Wert-Analysen und die oxidativen Stress-

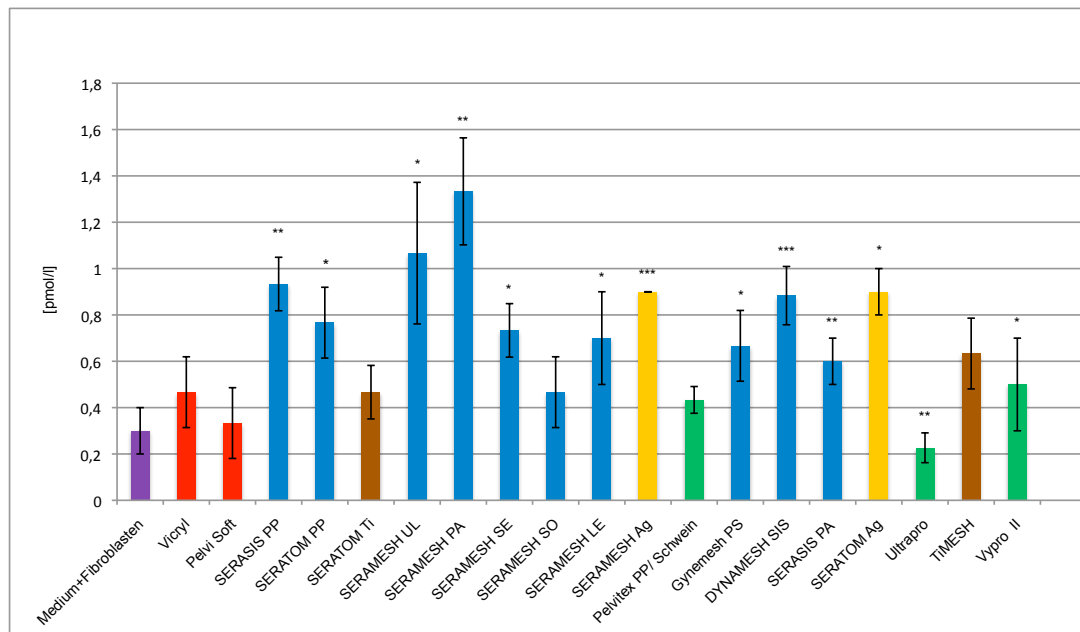


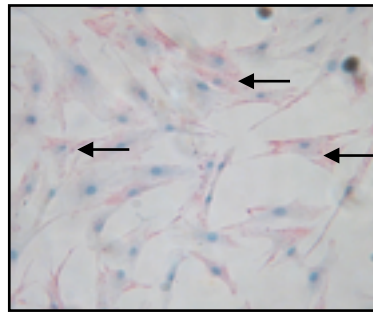
Abbildung 4.4: Metabolismus der Zelle: Nachweis des oxid. Stresses; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$) bezogen auf Medium + Fibroblasten.

messungen lagen alle im Normbereich und sprechen für eine normale Zellfunktion während des Kunststoffkontaktes.

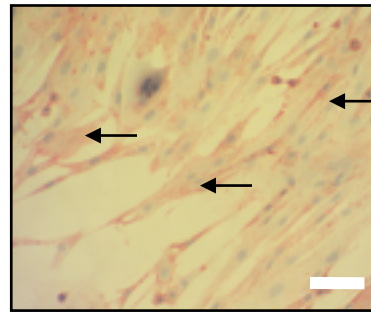
4.2 Immunhistochemie (IHC) und FACS-Analyse

Immunhistochemie

Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen Die immunhistochemische Charakterisierung der Fibroblasten wurde mit dem MAK Vimentin und dem Detektionskit ImmPRESS™ Universal Kit/Gegenfärbung Hämalaun durchgeführt. Farbstoff war LinRed (Abbildung 4.5). Positive Reaktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.



(a) Kommerz. Fibroblasten (PromoCell)



(b) Prim. Fibroblasten

Abbildung 4.5: Immunhistochemische Charakterisierung von kommerziellen und primären Fibroblasten; Vimentin positiv (rotes Zytoplasma); Skalierungsbalken = 250 μ m.

Reinheitstestung der Fibroblasten Die Prüfung auf Reinheit der Zellen gelang mit dem MAK CD68 und dem Detektionskit ImmPRESS™ Universal Kit (Farbstoff LinRed)/Gegenfärbung Hämalaun. Bei einer negativen Reaktion (lichtmikroskopisch kein rotes Zellmaterial ersichtlich) lag die Zellkultur ohne andere Gewebszellen vor und konnte zur Testung eingesetzt werden (Abbildung 4.6).

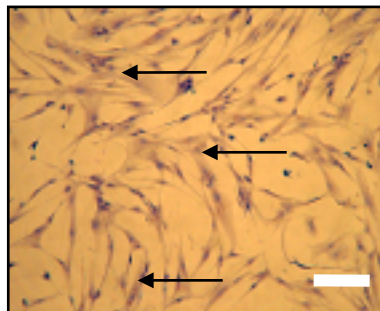


Abbildung 4.6: Prim. Fibroblasten; CD 68 neg. (blaue Kerne + blaues Zytoplasma) → nur Fibroblasten vorhanden; Skalierungsbalken = 250 μ m.

Rezeptorenanalyse Alle verwendeten Zellkulturen wurden auf Estrogen- ($ER\alpha$) und Progesteron-Rezeptor (PR) geprüft. In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse licht-

mikroskopisch dargestellt. Der PR war in den Kulturen schwach positiv und der ER α zeigte sich positiv. In der Abbildung wird ebenfalls die neg. Kontrolle aufgezeigt.

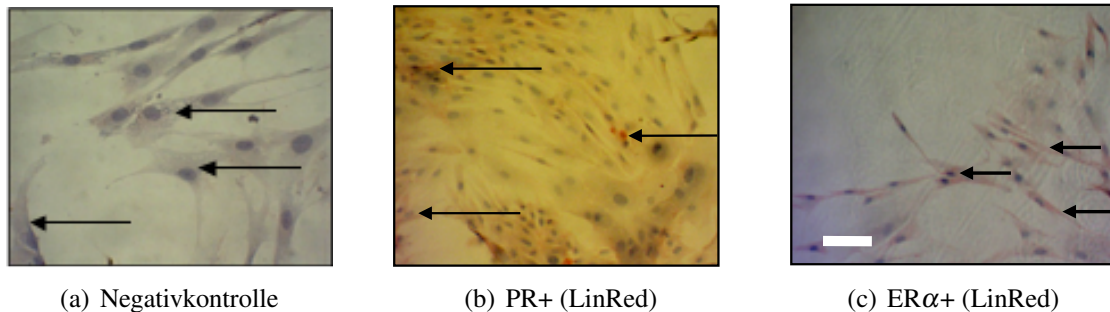


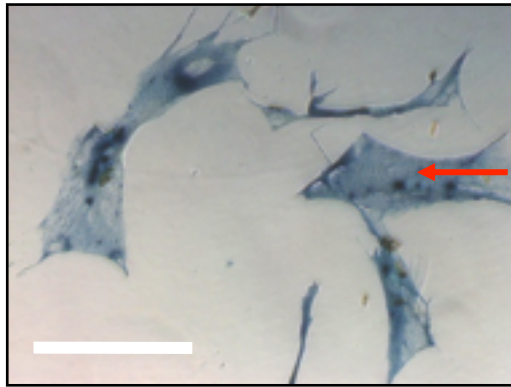
Abbildung 4.7: Rezeptoranalyse an primären Fibroblasten; blaue Kerne und rotes Zytoplasma; weißer Skalierungsbalken = 250 μ m

Immunhistochemische Auswertung der Apoptose mit dem p53-Marker

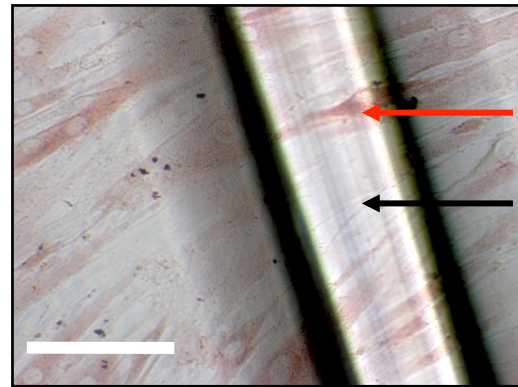
Mit dem p53-Marker konnte das Zellzykluswachstum überprüft werden. Apoptose ist ein genetisch programmierter Zelltod, der Zellen abbaut bzw. entfernt. p53 ist das Produkt eines Tumor-Suppressor-Antigens, dessen Ausfall zu erhöhtem Apoptoseverhalten in den Zellen führt. Bei Vorhandensein von p53 wird keine unnatürliche Apoptose ausgelöst.

Die Detektion gelang mit dem ImmPRESS™ Universal Kit. Als Farbstoffe kamen HistoGreen und LinRed zum Einsatz. Bei diesen Untersuchungen wurden keine Gegenfärbungen mit Hämalaun durchgeführt.

Für die Visualisierung wurden die Zellen mit den Kunststoffnetzen über einen Zeitraum von 12 Wochen in einer 24Well Platte inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Parameter auf der Platte. In Abbildung 4.8 konnte die Positivität der IHC-Reaktion bildlich dokumentiert werden.



(a) Nach Netzenfernung



(b) Mit PA-Faden

Abbildung 4.8: Primäre Fibroblasten p53+; blau-grüne Reaktion = HistoGreen, rote Reaktion = LinRed; weißer Skalierungsbalken = 250 μm .

Proliferationsnachweis mit Ki 67 Ki 67 ist ein Wachstumsmarker, d. h. er markiert die Zellen im Gewebe, die sich vermehren. Die Reaktion des Ki 67 gibt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Aber auch in der Entscheidung zwischen benignen, präneoplastischen und malignen Veränderungen kann die Darstellung des Proliferationsgrades durch Ki 67 wertvolle Hilfestellungen geben.

In Abbildung 4.9 wurde die immunhistochemische Reaktion mit dem Prognosefaktor Ki 67 festgehalten. Als Proliferationsmarker stand der Antikörper MIB-1 (Fa. DAKO) zur Verfügung. Detektion und Visualisierung war identisch mit dem p53-Nachweis. Im Ergebnis zeigte sich ebenfalls eine positive Reaktion.

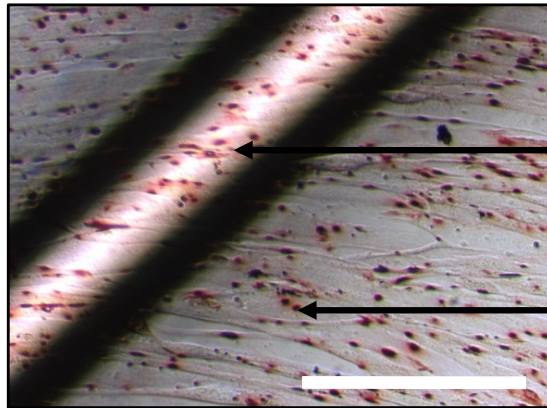


Abbildung 4.9: Prim. Fibroblasten mit PA-Faden; Ki 67+. Positive Reaktion in den Zellen mit LinRed = rote Färbung; weißer Skalierungsbalken = 250 μm .

FACS-Analyse

Analog zu den immunhistochemischen (qualitativen) Apoptosenachweisen erfolgten die quantitativen Apoptoseuntersuchungen mittels der Zellzyklusanalyse (Abbildung 4.10). Als Kontrolle standen adulte Fibroblasten ohne Netzmaterial zur Verfügung. Es konnte festgestellt werden, dass alle Zellzyklusanalysen der Fibroblasten + Netze sich ähnlich verhielten, wie die Fibroblastenkontrolle. Die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen lagen bei allen Materialien unter 10 % (Abbildung 4.11). Folglich wurde das Zellwachstum durch die Netze nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse wurden nur einmal bestimmt.

Fazit Bei den quantitativen FACS-Analysen und den Ergebnissen mit dem qualitativen Nachweis von apoptotischen Zellen während der Mesh-Kontakte mittels IHC liegt ein analoges Verhalten vor.

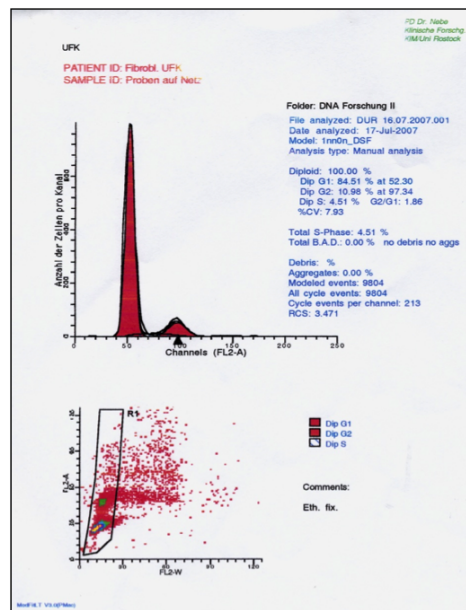


Abbildung 4.10: Beispielprotokoll einer FACS-Analyse.

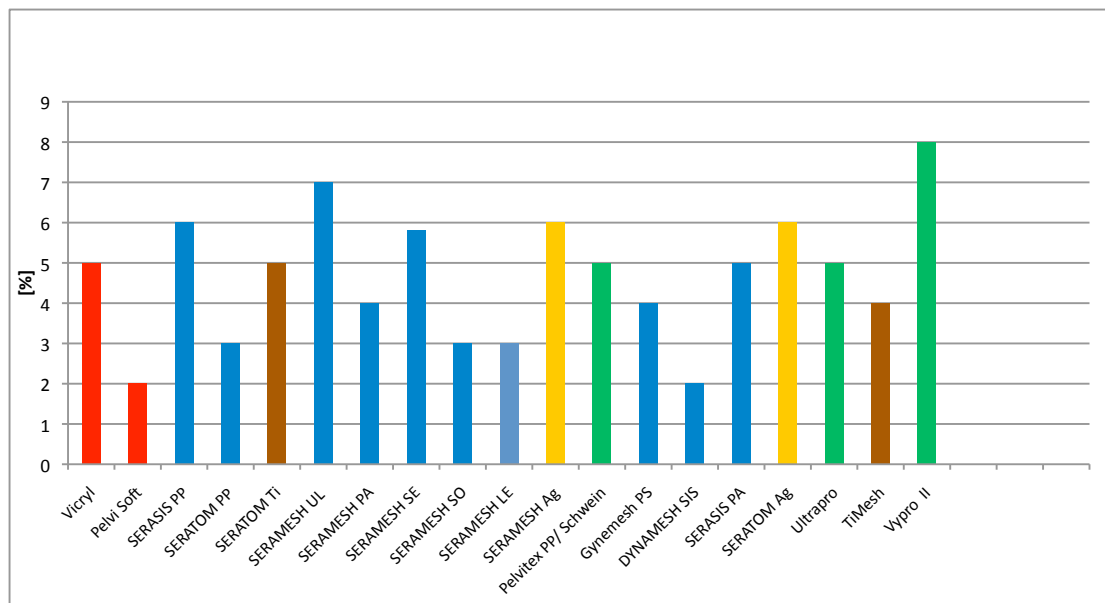


Abbildung 4.11: FACS-Analysen; Einfluss von verschiedenen Netzmaterialien auf das Apoptoseverhalten adulter Fibroblasten; dargestellt wurden die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen.

4.3 Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität

Proliferation (BrdU-Test)

In Abbildung 4.12 wurde das Zellwachstum mit dem Proliferationstest BrdU erfasst. Dargestellt ist der prozentuale Anteil des Fibroblastenwachstums mit Netzkontakt im Vergleich zum Wachstum der Fibroblasten ohne Netzmaterial, welches gleich 100 % gesetzt wurde. Als Ergebnis kam heraus, dass alle Netze eine Zellproliferation bei Netzkontakt im Versuchszeitraum hatten. Jedoch fielen gewaltige Proliferationsunterschiede in den unterschiedlichen Materialien auf. Die Proliferationszunahme betrug $\geq 200\%$. Eine besonders hohe Wachstumszunahme zeigte sich bei den nicht resorbierbaren Netzen mit Titan und Silberbeschichtung. Die kleinste Proliferationszunahme entstand in den nicht resorbierbaren Kunststoffen, wie SERASIS, SERATOM und Gynemesh PS.

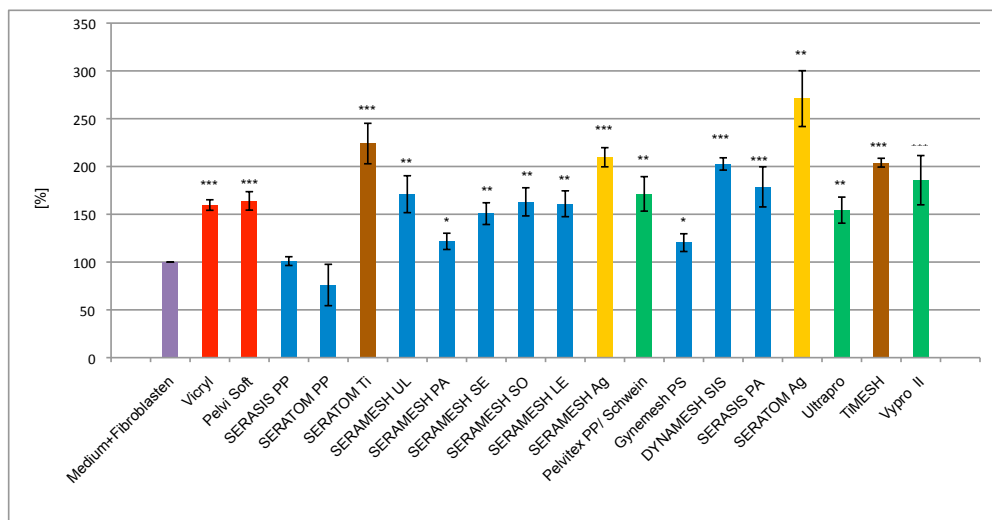


Abbildung 4.12: Proliferation der Fibroblasten mit Netzkontakt im Vergleich zu Fibroblastenproliferation ohne Netzkontakt = 100 %; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005).

Vitalitätsuntersuchungen mit dem MTT-Test

Der Nachweis der Vitalität auf mitochondrialer Ebene funktionierte mit dem MTT-Test der Fa. Roche. Das Ergebnis fiel sehr moderat aus. Die Vitalität der Fibroblasten während des Netzkontaktes wurde nicht gehemmt, sondern stieg geringfügig bis auf $\leq 123\%$ an. Zur Auswertung wurde auch beim MTT-Test die Vitalität der Zellen ohne Netzkontakt auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 graphisch dargestellt.

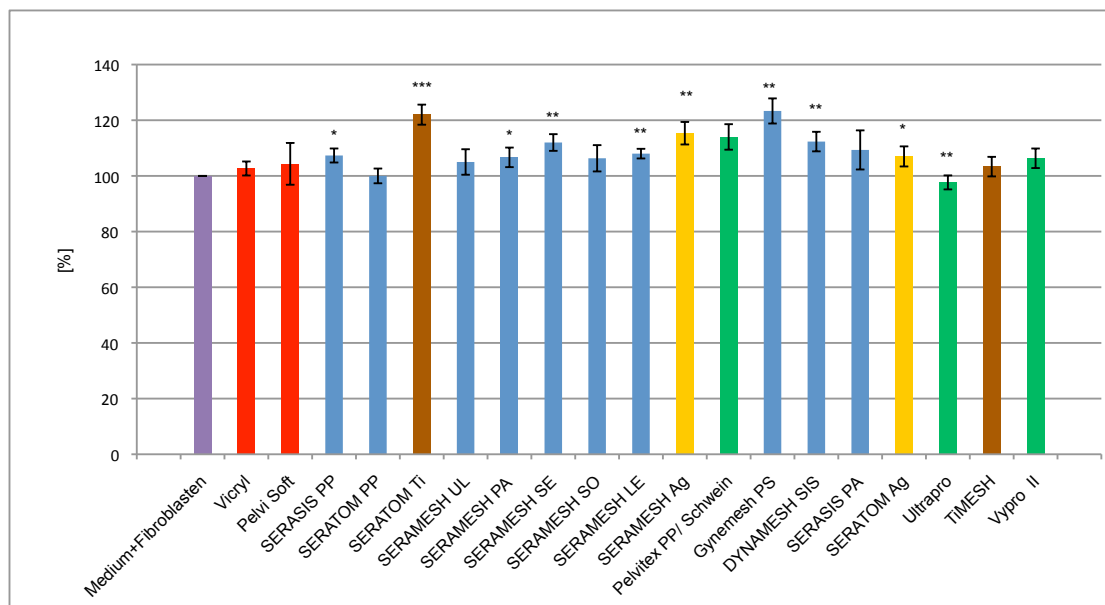


Abbildung 4.13: Prozentuale Darstellung der mitochondrialen Vitalität/Proliferation; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Zytotoxizitätsergebnisse mittels LDH-Test

Der Laktatdehydrogenase-Test (Fa. Roche) zeigte, dass in allen Netzvarianten nur eine sehr geringe Zytotoxizität von $\leq 25\%$ messbar war. Eine IC 50 konnte in keiner Netzvariante nachgewiesen werden und somit wirkten die Kunststoffe nicht toxisch auf die Zellen. Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Abbildung 4.14 einschließlich der Positivkontrolle Triton graphisch abgebildet. Die Positivkontrolle Triton wurde hier in Form eines schwarzen Balken dargestellt und auf 100 % gesetzt.

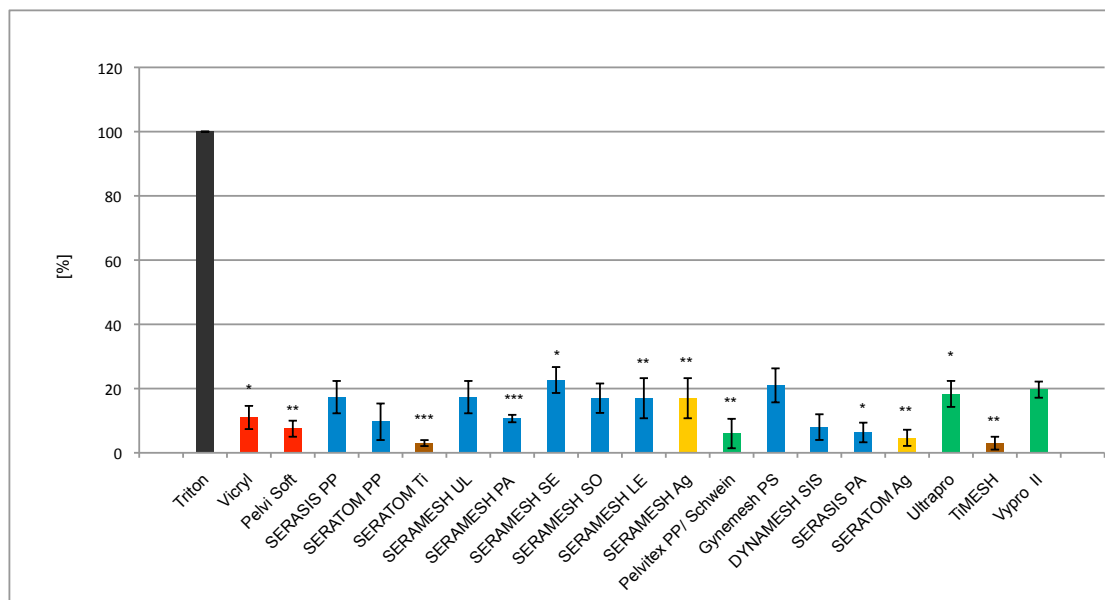


Abbildung 4.14: Zytotoxizität [%] der Netze bestimmt mit dem LDH-Test; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

Fazit Die Nutzung biochem. Assays zur Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität zeigten, dass durch die alle getesteten Materialien mit den Fibroblastzellen nicht nur gut bis sehr gut verträglich, sondern auch wachstumsfördernd wirkten.

4.4 Qualitative Auswertungen

Licht- und Rasterelektronenmikroskopie

Wie schon unter Material und Methoden (siehe Abschnitt 3.3, S.63f) beschrieben, werden Kunststoffe in Materialgruppen eingeteilt. Unterschieden wird in nicht, teil- und resorbierbare Materialien mit und ohne Beschichtung. Dabei spielen verschiedene Faktoren wie Porengröße, Filamentenstruktur etc. eine wesentliche Rolle. Unter Berücksichtigung dieser physikalischen bzw. mechanischen und chemischen Eigenschaften wurden die licht- und rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse betrachtet. Allerdings gab es zwei Ausnahmen. Die resorbierbaren Netze (Vicryl und Pelvi Soft) konnten aufgrund der eingesetzten Netzresorbierung nicht mit einfließen. Die teilresorbierbaren Netze konnten nur bedingt verglichen werden. Die Auflösung des resorbierbaren Anteils in den Netzmaterialien war soweit fortgeschritten, dass auch hier nur noch nach der Inkubationszeit (≤ 12 Wochen) der nicht resorbierbare Netzanteil zur Auswertung vorlag.

In den folgenden Abbildungen wird jeweils ein licht- und rasterelektronenmikroskopisches Bild von den Netzmaterialien nach ≤ 12 Wochen dokumentiert.

1. Ergebnisse der nicht resorbierbaren Netze mit und ohne Beschichtung (Fa.: SE-RAG WIESSNER GmbH & Co. KG)

Das Netz SERAMESH UL ist von der textilen Grundkonstruktion identisch mit dem Netz SERATOM. Der einzige Unterschied besteht nur in der Form.

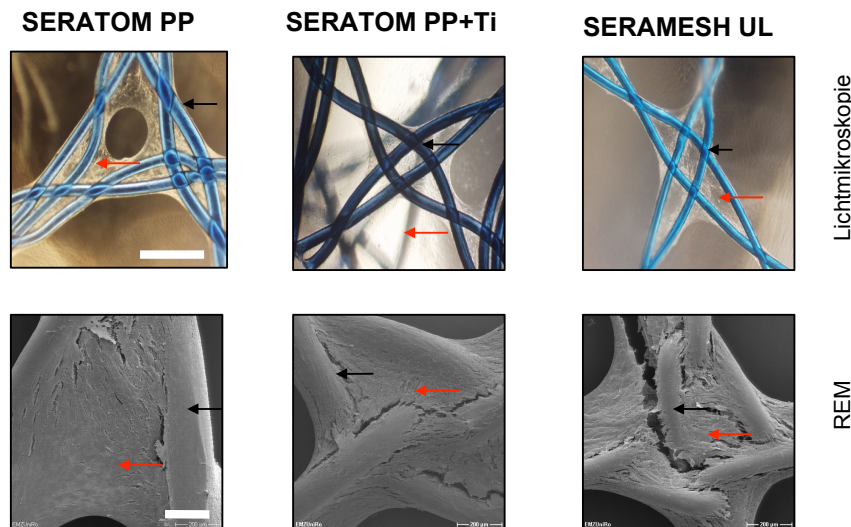


Abbildung 4.15: Im Vergleich verschiedene nicht resorbierbare Netze (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG.; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil), 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μm , REM = 200 μm .

Fazit Das Material PP vom SERATOM und SERAMESH UL wurde von den Zellen gut angenommen. In derselben Zeit wuchsen die Fibroblasten schneller in die titanisierte Variante. Wie in der lichtmikroskopischen Abbildung des SERATOM + Titan-Beschichtung gut ersichtlich, musste während der Inkubation bereits nach 6 Wochen ein zusätzliches Netz von 10 mm \times 10 mm in die Zellkultur gelegt werden. Zu dem Zeitpunkt war der Bewuchs der Maschen mit Fibroblastenzellen 100 %ig abgeschlossen, so dass die Zellen keinen weiteren Stoffwechsel mehr durchführen konnten und die Gefahr bestand, dass diese absterben.

2. Ergebnisse der nicht resorbierbaren Netze (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG)

In der Abbildung 4.16 wurden PP-Netze (100 %) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG) zum Vergleich dargestellt. Diese unterschieden sich in ihren

Filamenten (monofil / multifil) und in ihren Porengrößen. Die SERAMESH UL und SO bestanden aus monofilen Filamenten, die SERAMESH LE und SE hingegen waren multifil. Die Netze mit der Porengröße LE und UL hatten große Poren und die Netze SE und SO kleine Poren.

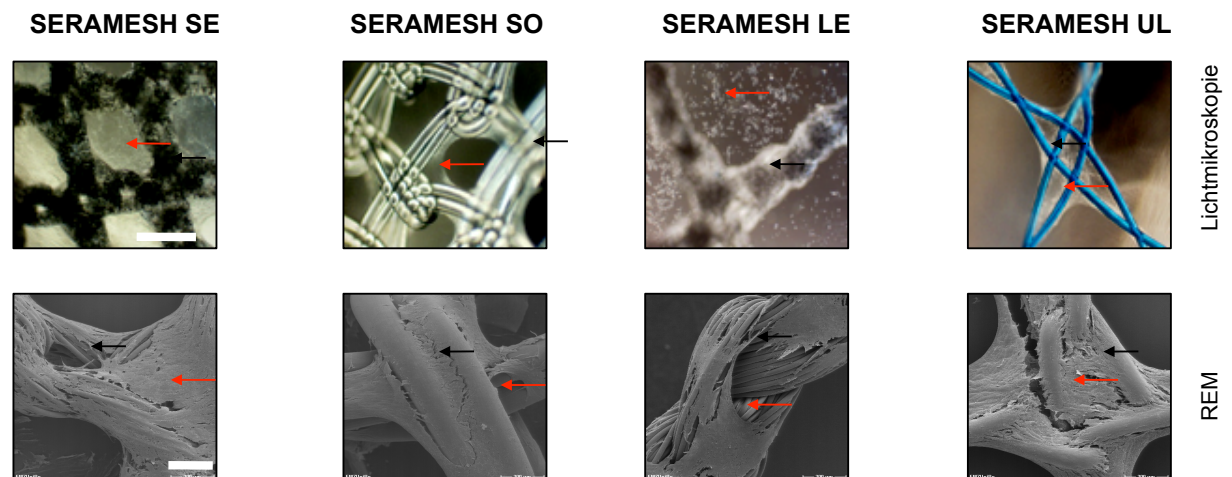


Abbildung 4.16: Im Vergleich verschiedene nicht resorbierbare SERAMESH-Netze mit unterschiedlicher Porengröße und Filamentstrukturen (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG.; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil), 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μ m, REM = 200 μ m.

Fazit Der Bewuchs der Netze SERAMESH SE und UL erwies sich als sehr gut. Beim SERAMESH SO lag eine gute Zelladhärenz vor. Hingegen beim SERAMESH LE zeigte sich hauptsächlich lichtmikroskopisch nur eine mäßige Zelladhärenz. Das Netz SERAMESH UL ist identisch mit dem Netz SERATOM.

3. Ergebnisse der nicht resorbierbaren Netze (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon)

In der Abbildung 4.17 standen die Zelladhärenzen der Netze SERATOM und SERAMESH UL (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG) dem Netz Gynemesh PS (Fa. Ethicon) im Vergleich gegenüber. Bei diesen drei nicht resorbierbaren Netzen handelte es sich um 100 % PP-Material.

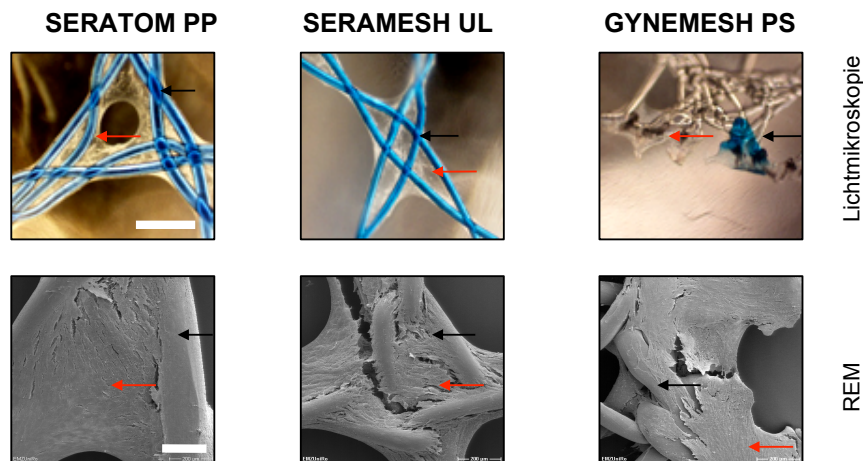


Abbildung 4.17: Nicht resorbierbare PP-Netze (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co.KG. im Vergleich zu dem PP-Netz Gynemesh der Fa. Ethicon; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μ m, REM = 200 μ m.

Fazit Das Netz SERATOM und das Netz SERAMESH UL bestand aus dem gleichen Material. Im Vergleich zum Netz Gynemesh PS konnte in punkto Zelladhärenz kein Unterschied gefunden werden. Alle drei Netze wurden von den Fibroblasten gut angenommen. Der Bewuchs während der Inkubation zeigte sich gut bis sehr gut. Auffallend waren hier die unterschiedlichen Randstrukturen, die gegebenenfalls zu Erosionen im Probanden führen können.

4. Ergebnisse von nicht resorbierbaren, un- und beschichteten Netzen (Fa. SERAG

WIESSNER GmbH & Co. KG und der Fa. Ethicon

In der folgenden Abbildung (Abbildung 4.18) werden nicht resorbierbare un- und beschichtete Netze verglichen. Alle vier Netze hatten als nicht resorbierbares Material das PP. Zwei Netze waren zusätzlich mit Titan beschichtet. Die Netze SERATOM Ti, SERATOM PP und SERAMESH UL stammen von der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und das TiMesh wurde von der Fa. pfm bereitgestellt. Form und Porengröße waren unterschiedlich. Bei den vier Netzen handelte es sich jeweils um eine monofile Filamentenstruktur.

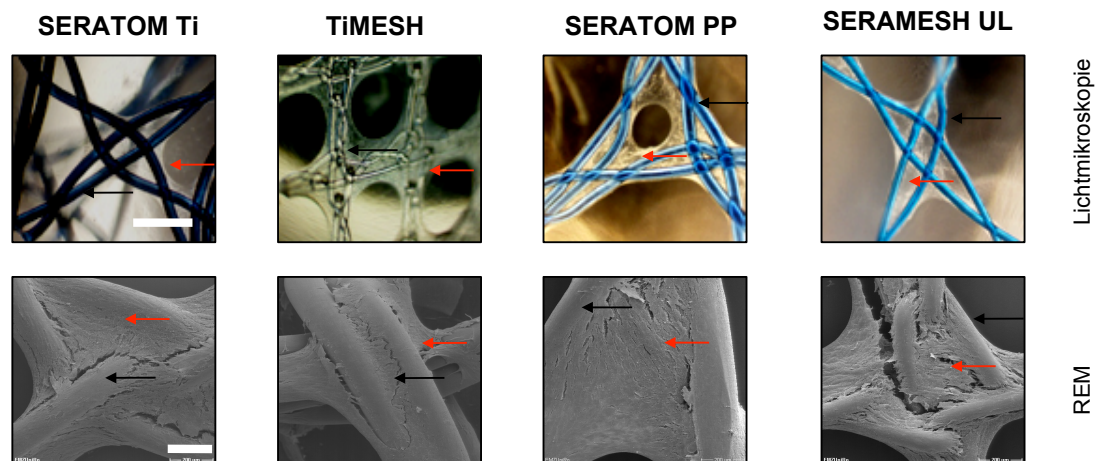


Abbildung 4.18: Im Vergleich standen nicht resorbierbare PP-Netze (schwarzer Pfeil) und beschichtete Materialien (PP+PP/Ti) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und der Fa. pfm; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μm , REM = 200 μm .

Fazit Sowohl bei den beschichteten als auch bei den unbeschichteten Netzvarianten war eine sehr gute Zelladhärenz sichtbar. Der Unterschied bestand im zeitlichen Wachstumsverhalten der Zellen. Es war eine rasante Adhärenz bei dem

titanbeschichteten Netz SERATOM Ti zu beobachten. Im gleichen Inkubationszeitraum musste hier zusätzlich ein Netzstück über das primäre gelegt werden, damit die Versuchsbedingungen für alle genutzten Proben erhalten blieben. Jedoch die Zelladhärenz des TiMeshes erwies sich gegenüber den unbeschichteten Netzen als gleichwertig.

5. Ergebnisse von nicht resorbierbaren, unbeschichteten PP- Netzen im Vergleich zu einem nicht resorbierbaren silberbeschichteten PP-Netz (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG)

In Abbildung 4.19 wurden drei PP-Netzvarianten (100 %ig PP) mit einem Silbernetz (PP + Ag) verglichen. Alle vier Netze stammen von der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG. Auch hier handelte es sich ausschließlich um monofile Netzstrukturen, die sich aber in der Form und in der Porengröße unterschieden.

Fazit Auch hier gilt, sowohl bei den beschichteten, als auch bei der unbeschichteten Netzvariante waren sehr gute Zelladhärenzen zu erkennen. Genauso wie bei der Titanbeschichtung, war auch bei dem Silbernetz ein sehr schneller Zellbewuchs in den Maschen zu beobachten. Allerdings war hier kein Einlegen eines Extranetzes während des Inkubationszeitraumes nötig. Das Silbernetz verhielt sich am Versuchsende moderat zu dem SERAMESH UL (PP). Die Struktur des SERAMESH Ag und des SERAMESH UL waren identisch.

6. Ergebnisse von teilresorbierbaren PP-Netzen (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon)

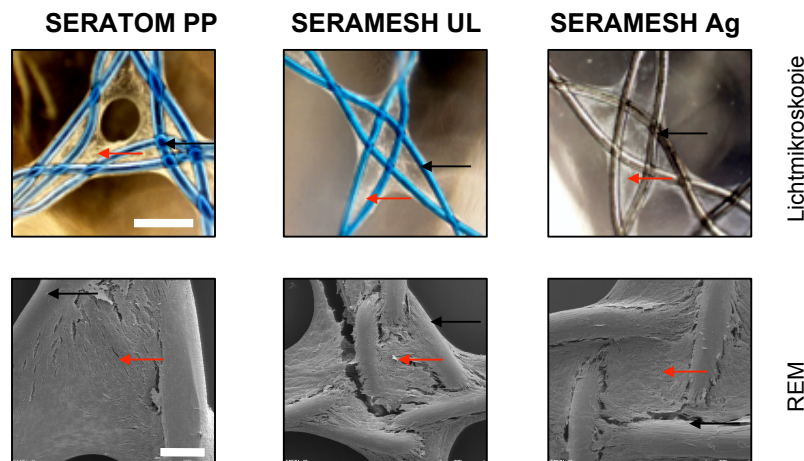


Abbildung 4.19: Im Vergleich standen nicht resorbierbare, unbeschichtete PP- Netze zu einem nicht resorbierbaren silberbeschichteten PP-Netz der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG (schwarzer Pfeil); adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μm , REM = 200 μm .

Die folgende Abbildung (Abbildung 4.20) zeigt die Ergebnisse von drei teilresorbierbaren Materialien. In den Netzen bildete das PP den nicht resorbierbaren Anteil. Bei den Netzen handelte es sich um das Netz SERAMESH PA, der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG, bestehend aus PP/PGACL (Polypropylen + Polyglycolsäure-E-Caprolacton) und den Netzen Vypro II bestehend aus PP/PGA-LPLA (Copolymer 90-10) und dem Ultrapro, dessen resorbierbarer Anteil ebenfalls PGACL war, beide Fa. Ethicon. Das Netz SERAMESH PA war partiell absorbierbar, bestand aus einem Biokomponentenfaden und lag als monofile Filament vor. Das Netz Vypro II war multifil (2-Fadensystem) und hatte weite Maschen. Das Ultrapro war ein Netz, das auch aus 2-Fadensystemen bestand, die nebeneinander verknüpft waren. Es hatte eine monofile Filamentenstruktur.

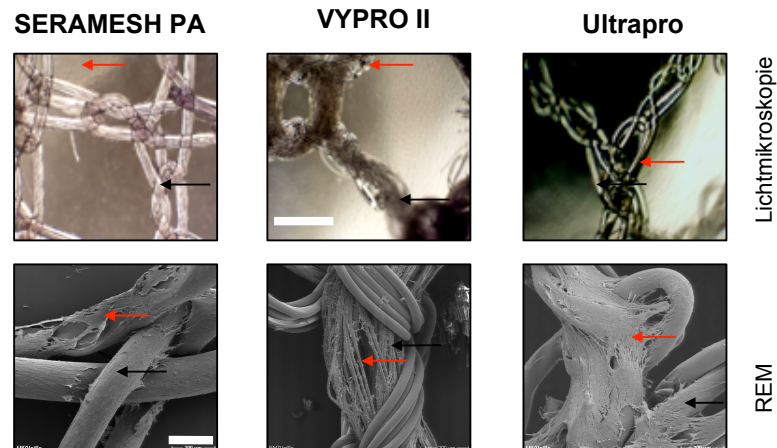


Abbildung 4.20: Ergebnisse von teilresorbierbaren PP-Netze der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon (schwarzer Pfeil); adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μm , REM = 200 μm .

Fazit Die Netze SERAMESH PA und Ultrapro hatten die gleiche chemische Zusammensetzung, gleiche Porengröße und waren monofil. Diese beiden teilresorbierbaren Materialien zeigten keinen Unterschied hinsichtlich der Zelladhärenz. Das Netz Vypro II, ein multifiles Filament, erwies sich bezüglich der Zelladhärenz als ungünstig. Hier ließen sich weder lichtmikroskopisch noch rasterelektronenmikroskopisch gute Zelladhärenzen nachweisen.

7. Vergleich der Ergebnisse von nicht resorbierbaren PP- Netzen (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon) mit einem nicht resorbierbaren PVDF-Netz (Fa. Dahlhausen)

In der nächsten Abbildung (Abbildung 4.21) wurden nicht resorbierbare Materialien von verschiedenen Firmen miteinander verglichen. Dafür konnten zwei PP-Netze und ein PVDF- Netz genutzt werden. Diese Netze wiesen unterschiedliche Maschengrößen auf. Die Randstrukturen, die Maschenverknüpfungen, die chemi-

schen Zusammensetzungen und die Porengröße waren ebenfalls andersartig.

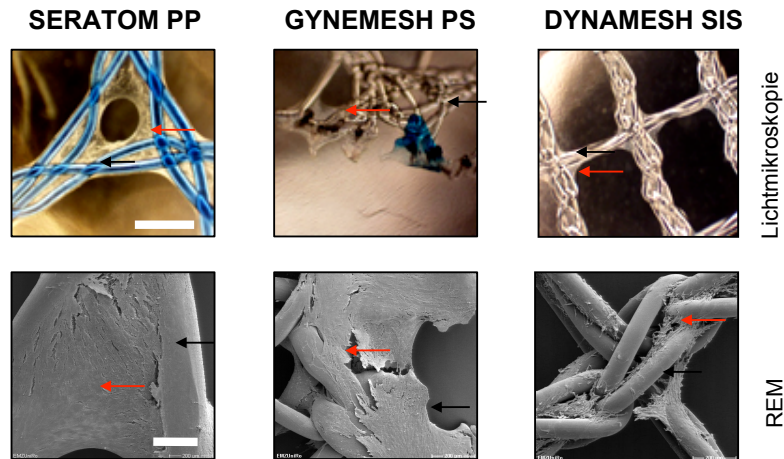


Abbildung 4.21: Vergleichen der Ergebnisse von einem nicht resorbierbaren PP- Netz (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon) mit einem nicht resorbierbaren PVDF-Netz (Fa. Dahlhausen); Netzmaschen = schwarze Pfeile; adulte Fibroblastenzellkultur = roter Pfeil; 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 μm , REM = 200 μm .

Fazit Die PP-Materialien und das PVDF zeigten eine gleich gute Zelladhärenz. Sowohl PP und auch PVDF waren gut kompatibel mit den Gewebezellen. Welche Maschengröße am günstigsten für eine Implantation ist, hängt von den äußeren Gegebenheiten des jeweiligen Probanden ab.

Qualitative und quantitative Ergebnisse der EDX-Analysen

Von allen Netzen gelang jeweils eine EDX-Analyse. Aufgrund dessen, dass der nicht resorbierbare Anteil bei den genutzten Materialien (Tab. 18) entweder PP und PVDF war, wurden die Bestimmungen der chemischen Zusammensetzung an vier Beispielen [2x

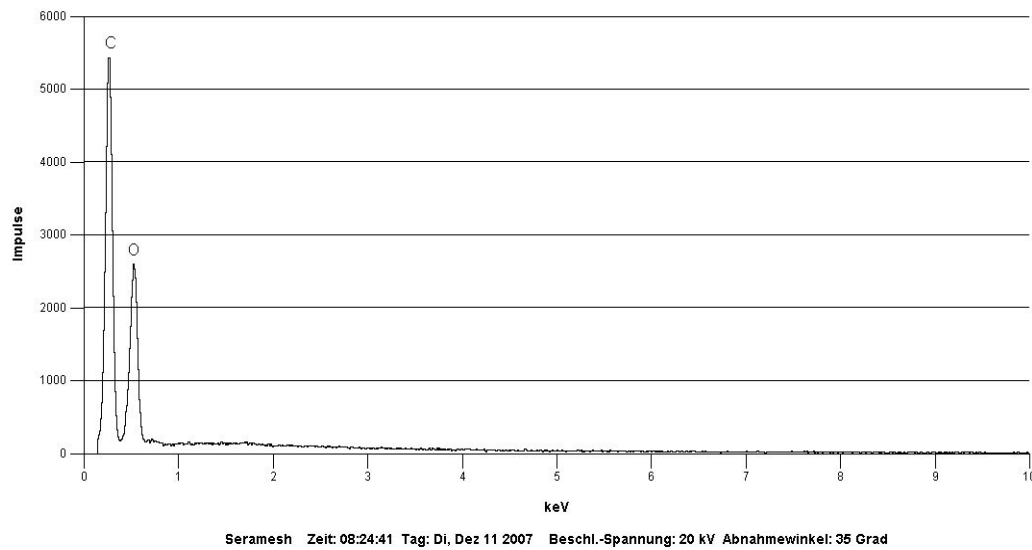


Abbildung 4.22: EDX-Analyse des nicht resorbierbaren Netzes SERAMESH (100 % PP); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff).

Tabelle 4.1: Elementgehalt [%] vom Netz SERAMESH; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff.

Element	Atom-%	Verbindung	Masse-%
C	66,74	C	57,44
O	33,26	O	42,56
Gesamt	100		100

unbeschichtet (Abbildung 4.22 und Abbildung 4.23); 1x beschichtet mit Silber (Abbildung 4.24); 1x beschichtet mit Titan (Abbildung 4.25)] gezeigt. Die EDX-Analysen von den teil- und resorbierbaren Netzen konnten nicht berücksichtigt werden, da diese Untersuchungen immer im Anschluss der Zellinkubation stattfanden und der resorbierbare Anteil des jeweiligen Netzes bereits physiologisch reduziert war. Es sind die Elemente der Kunststoffe graphisch und tabellarisch dargestellt worden.

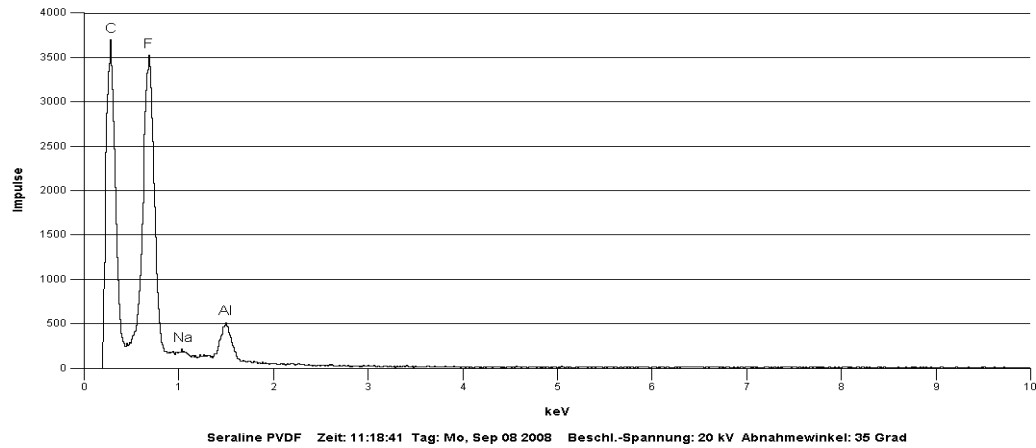


Abbildung 4.23: EDX-Analyse des nicht resorbierbaren Netzes DYNAMESH SIS (100 % PVDF); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, F: Fluor, Al: Aluminium).

Tabelle 4.2: Elementgehalt [%] vom Netz DYNAMESH SIS; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff, F: Fluor, Na: Natrium, Al: Aluminium.

Element	Atom-%	Verbindung	Masse-%
O	10,0	O	25,81
C	40,00	C	29,03
F	49,32	F	44,28
Na	0,50	Na	0,68
Al	0,18	Al	0,20
Gesamt	100		100

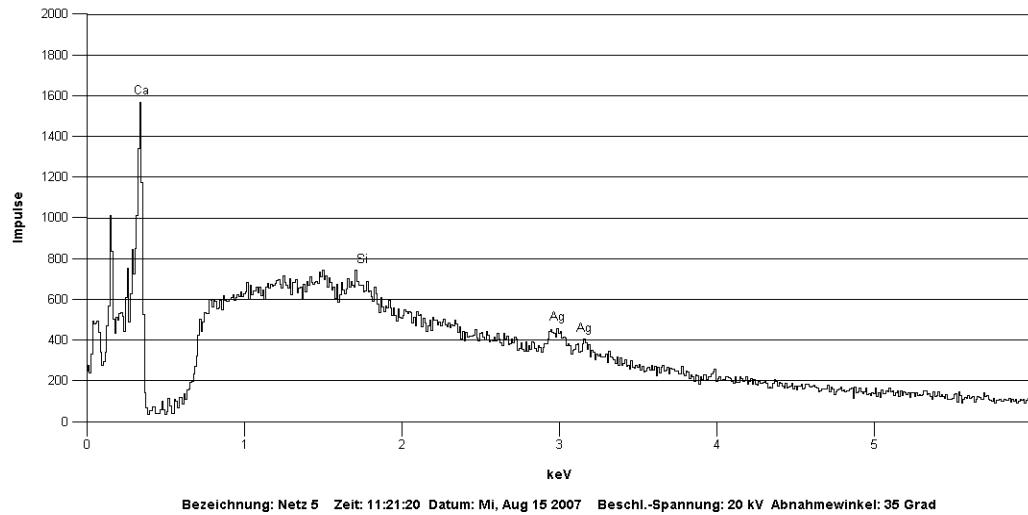


Abbildung 4.24: EDX-Analyse des nicht resorbierbaren/beschichteten Netzes SERAMESH Ag (PP + Ag); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, Ag: Silber, Ca: Kalzium, Si: Silizium).

Tabelle 4.3: Elementgehalt [%] von dem Netz SERAMESH Ag; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff, Ag: Silber, Ca: Kalzium, Si: Silizium.

Element	Atom-%	Verbindung	Masse-%
Ag	9,39	Ag	25,80
C	40,66	C	28,01
O	49,38	O	45,29
Ca	0,39	Ca	0,61
Si	0,18	Si	0,29
Gesamt	100		100

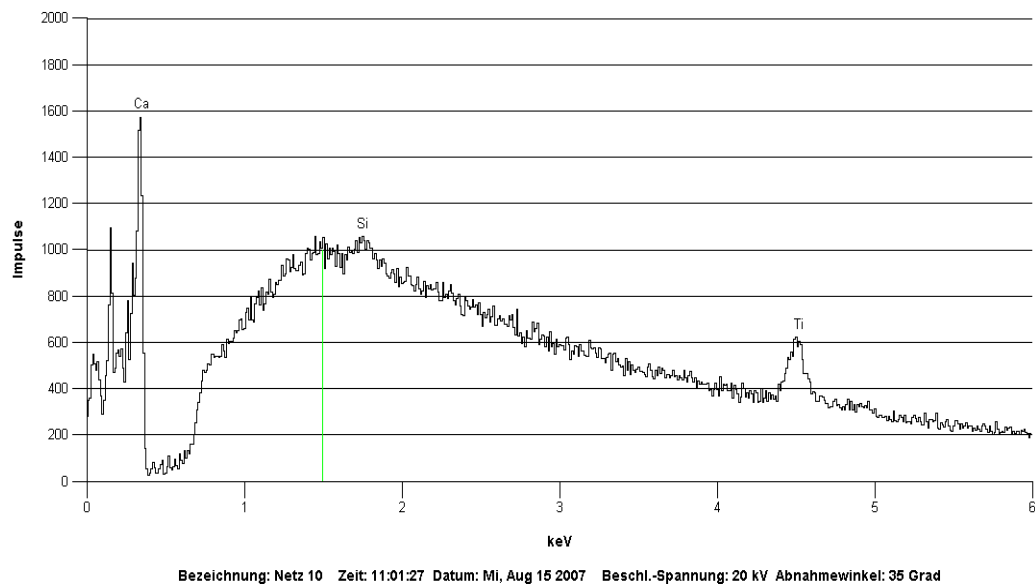


Abbildung 4.25: EDX-Analyse des nicht resorbierbaren/beschichteten Netzes SERATOM Ti (PP +Ti); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, Ti: Titan, Si: Silizium, Ca: Kalzium).

Tabelle 4.4: Elementgehalt [%] vom Netz SERATOM Ti; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff, Ti: Titan, Ca: Kalzium, Si: Silizium.

Element	Atom-%	Verbindung	Masse-%
Ti	9,09	Ti	22,80
C	40,66	C	29,01
O	49,38	O	47,29
Al	0,39	Al	0,61
Si	0,48	Si	0,29
Gesamt	100		100

Fazit In den o.g. Materialien konnten die Elemente bestätigt werden, die auf den Firmendokumenten verzeichnet waren. Zusätzlich führten die EDX-Untersuchungen in einigen Kunststoffen zum Nachweis von Silizium, Kalzium und Natrium. Diese Elemente dienten bei der Herstellung als Katalysatoren. Auch Aluminium wurde gemessen. Die Kunststoffe mussten vor der Messung auf einen Stempel aufgeblockt werden, der aus Aluminium bestand. Traf während der Messung der Elektronenstrahl diesen Block, kam es zu einer Aluminiumdetektion.

4.5 Adhärenz-Quantifizierung mit ImageJ und iCycler

ImageJ-Auswertung

Mit ImageJ konnte die Zelladhärenz in den Maschen prozentual ermittelt werden. Für diese quantitative Analyse waren resorbierbare Netzvarianten (Vicryl und Pelvi Soft) nicht geeignet. Die teilresorbierbaren Netze SERAMESH PA und Pelvitex/Schwein waren nicht auswertbar. In Abbildung 4.26 wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Der Versuch hatte nur einmal stattgefunden, daher konnte keine weitere Statistik berechnet werden.

In den nicht resorbierbaren Netzen war eine gute Zelladhärenz mit dieser Auswertungsmethode ersichtlich. Bei der beschichteten Netzvariante SERATOM Ti stellte sich ein besonders hoher Zellbewuchs heraus. Hingegen zeigte sich beim Netz Vypro II eine schlechte Adhärenz. Die Ergebnisse aus dem ImageJ-Programm und die der Licht- und Rasterelektronenmikroskopie verhielten sich zueinander moderat.

Tabelle 4.5: Auflistung der prozentualen Zelladhärenz mit ImageJ.

Netz	[%]	Netz	[%]
SERASIS PP	53,8	Gynemesch PS	41,55
SERATOM PP	92	SERAMESH PA	55,6
SERATOM Ti	176	DYNAMESH SIS	100
SERAMESH UL	100	SERASIS PA	38
SERAMESH PA	38	SERATOM Ag	100
SERAMESH SE	100	Ultrapro	53,6
SERAMESH SO	58	TiMESH	72
SERAMESH LE	nicht auswertbar	VYPRO II	5
SERAMESH Ag	100	Pelvitex/Schwein	nicht auswertbar
Vicryl	nicht auswertbar		

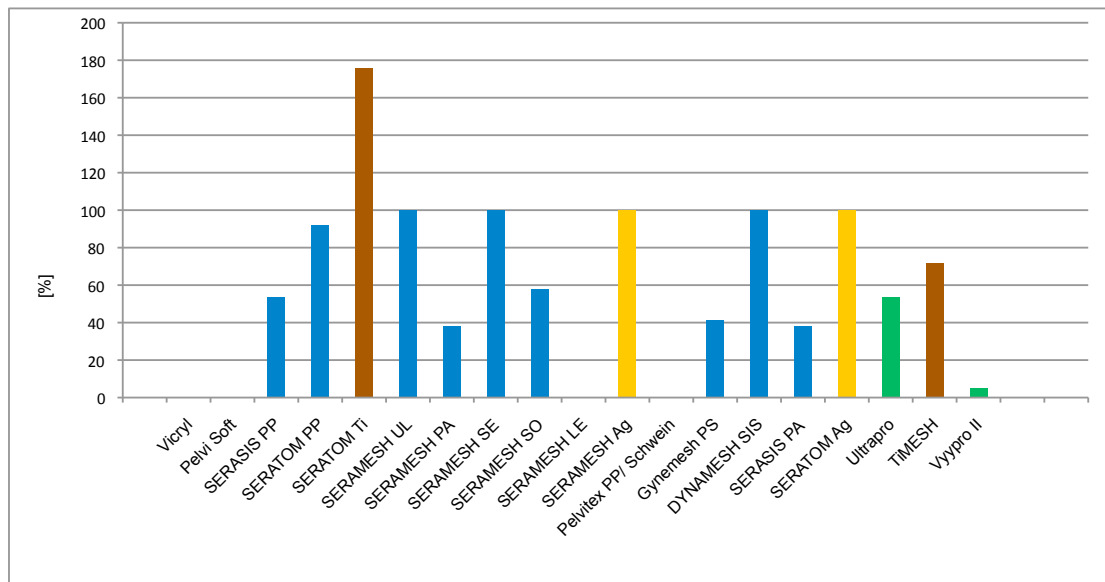


Abbildung 4.26: Graphische Auswertung der Zelladhärenz mit ImageJ.

Molekularbiologische Ergebnisse am iCycler

Es erfolgte eine Quantifizierung der Zelladhärenz am iCycler unter Einbeziehung der Marker β -Actin und Vimentin (Abbildung 4.28; Tabelle 4.6).

Für diese Untersuchungen war es nötig eine spezifische Schmelzkurve zu erstellen (Abbildung 4.27). Am iCycler ergaben sich in den Netzvarianten differente Zelladhärenz-konzentrationen, die zusammen mit den o. g. Ergebnissen (siehe Abschnitt 4.4 auf Seite 84) betrachtet werden müssen. Demzufolge zeichneter sich nachstehende Aussagen ab.

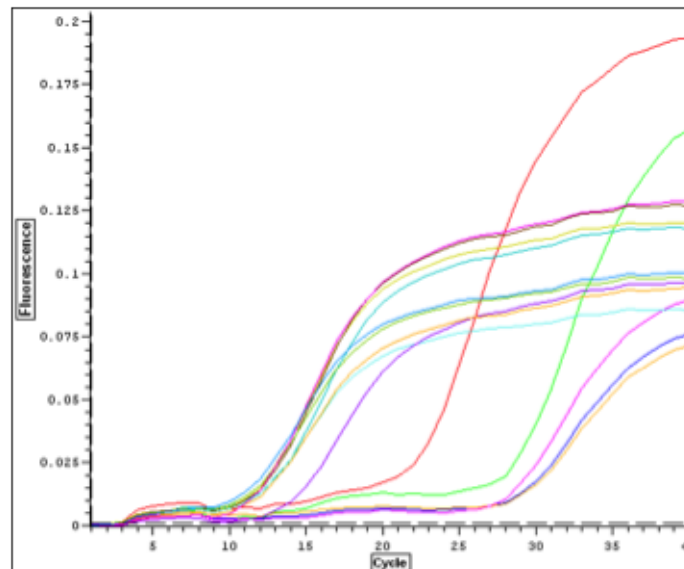


Abbildung 4.27: Schmelzkurve für die Quantifizierung der Zelladhärenz am iCycler.

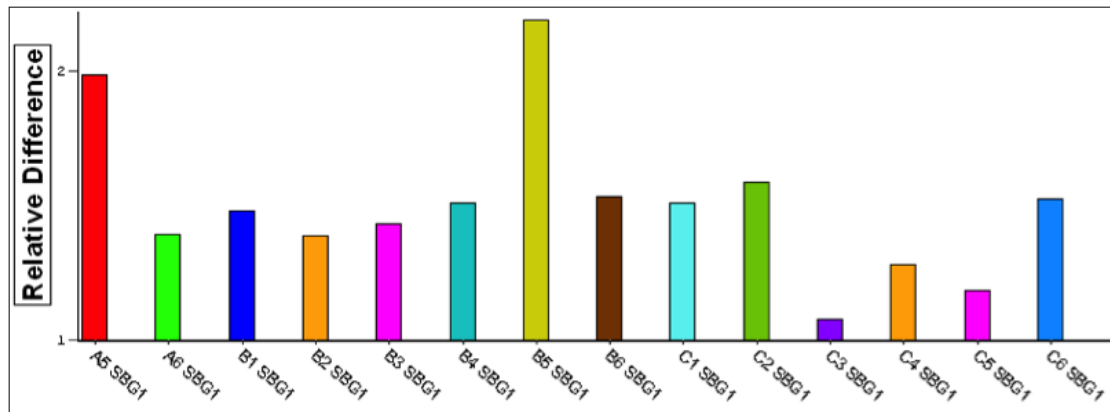


Abbildung 4.28: Graphische Darstellung der Zelladhärenz durch molekularbiologische Arbeitstechnik.

Tabelle 4.6: Marginalie zur graphischen Darstellung der Zelladhärenz auf der Ebene der Molekularbiologie; (Abbildung 4.28).

Nr.	Netz	Nr.	Netz
A6	TiMESH	C1	SERAMESH LE
B1	Ultrapro	C2	SERATOM Ti
B2	Gynemesh PS	C3	Vypro II
B3	SERAMESH Ag	C4	SERAMESH UL
B4	SERAMESH PA	C5	SERATOM PP
B5	SERAMESH SE	C6	DYNAMESH SIS
B6	SERAMESH SO	A5	Kontrolle

4.5.1 Einordnung der Zwischenergebnisse

Das Zusammenfassen der Ergebnisse aus diesen Teilgebieten berücksichtigt die unterschiedlichen Netzeigenschaften (Material, Porengröße und Fadenaufbau). Es konnte festgestellt werden:

1. Material

- SERAMESH SE; SERATOM Ti; SERATOM PP; SERAMESH UL:

Diese Netze bestanden alle aus dem Material PP. Sie zeichneten sich durch eine sehr gute Zelladhärenz aus. SERATOM Ti, ein Netz mit Ti-Beschichtung, zeigte sowohl am iCycler als auch in der Mikroskopie eine hervorragende Zelladhärenz.

- SERAMESH PA; SERAMESH Ag; SERATOM Ti

Die beschichteten Varianten präsentierten größere Zelladhärenzen als unbeschichtete Materialien. Diesbezüglich erwies sich das Netz mit Titanbeschichtung als äußerst geeignet.

- ULTRAPRO; Gynemesh PS; SERAMESH PA; Vypro II; SERAMESH UL
ULTRAPRO; Gynemesh PS; SERAMESH PA; SERAMESH UL offenbarten ähnlich gute Zelladhärenzen. Das Vypro II bestand aus dem gleichen Hauptmaterial (PP), zeigte aber eine schlechte Zelladhärenz am iCycler und auch in der Mikroskopie.

- SERASIS PP und TiMesh:

Sowohl der titanisierte, als auch der nichtbeschichtete Kunststoff wiesen eine sehr gute Zelladhärenz auf.

2. Porengröße

Gynemesh PS; SERAMESH SO; SERAMESH UL; SERAMESH SE und SERAMESH LE:

Bis auf die Netzmuster SERAMESH SE/SO lagen gleiche Porengrößen und gute Zelladhärenzen vor. Das Netz SERAMESH SE besaß ein sehr gutes Zellwachstum, als Folge einer großen Oberfläche verfügte, die den Zellen viel Halt bot.

3. Fadenaufbau SERAMESH SE und SERAMESH SO

Beide Kunststoffnetze basieren auf gleicher Porengröße, aber wiesen eine unterschiedliche Zelladhärenz auf. Der Unterschied zwischen den Netzen bezieht sich auf monofil (SERAMESH SO) und multifil (SERAMESH SE), wobei sich das multifile Netz als geeigneter erwies.

SERAMESH LE und SERAMESH UL

Die großporigen Netze SERAMESH LE (multifil) und SERAMESH UL (monofil) zeigten unterschiedliche, z. T. sehr gute Zelladhärenz (SERAMESH UL).

4.6 Physiologische und pharmakodynamische Effekte

Effekte

Die Untersuchungen der physiologischen und pharmakodynamischen Effekte an speziell ausgesuchten Kunststoffen wurden von der Fa. Bionas GmbH durchgeführt (Bionas 2500® analyzing system).

Durch diese Untersuchungen konnte eine lückenlose Überwachung von drei Parametern (Atmung, Zellimpedanz, Ansäuerung) erfasst werden. Es handelte sich dabei nicht um Endpunktbestimmungen, sondern es ergab sich erstmalig die Möglichkeit, kontinuierliche Messungen über einen längeren Zeitraum an Zellen durchzuführen. Die Aussagen sind im Folgenden graphisch dargestellt⁷⁸.

1. Atmung (Abbildung 4.29)
2. Zellimpedanz (Abbildung 4.30)
3. Ansäuerung (Abbildung 4.31)

Fazit Bei den pharmakodynamischen Effekten (Atmung, Zellimpedanz, Ansäuerung) zeigten sich am Silber-, SERAPREN- und SERALENE-Faden (nicht resorbierbar) keine Beeinflussung des Zellmetabolismus. Jedoch wird der Zellmetabolismus von den teil- und resorbierbaren Fäden (Proflex, SERAFast/Monofast) signifikant beeinflusst. Diese Resultate waren teilweise reversibel.

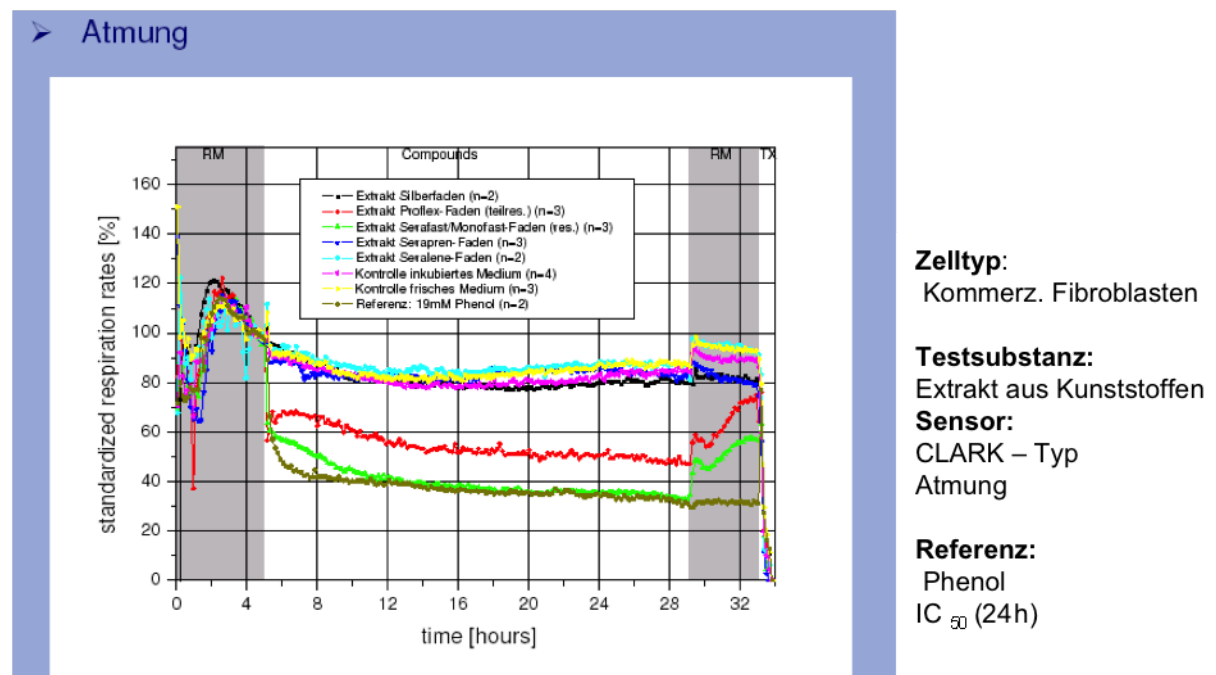
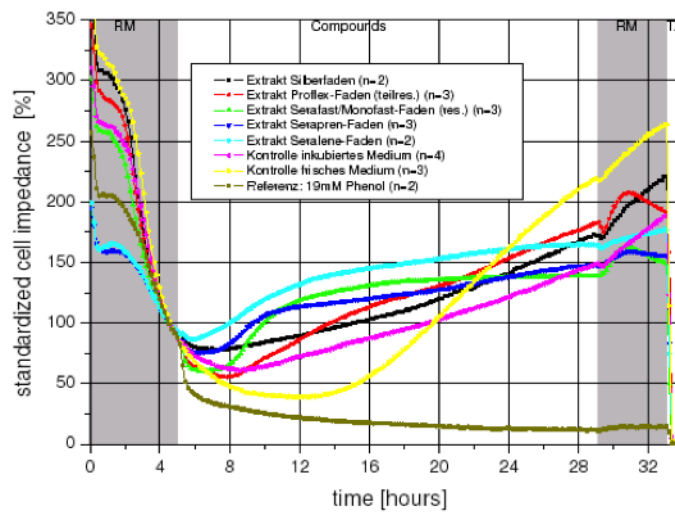


Abbildung 4.29: Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Atmung¹¹¹.

➤ Adhäsion (Zellimpedanz)

**Zelltyp:**

Kommerz. Fibroblasten

Testsubstanz:

Extrakt aus Kunststoffen

Sensor:CLARK – Typ
Adhäsion**Referenz:**Phenol
IC₅₀ (lit. 24 h)Abbildung 4.30: Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Adhäsion¹¹¹.

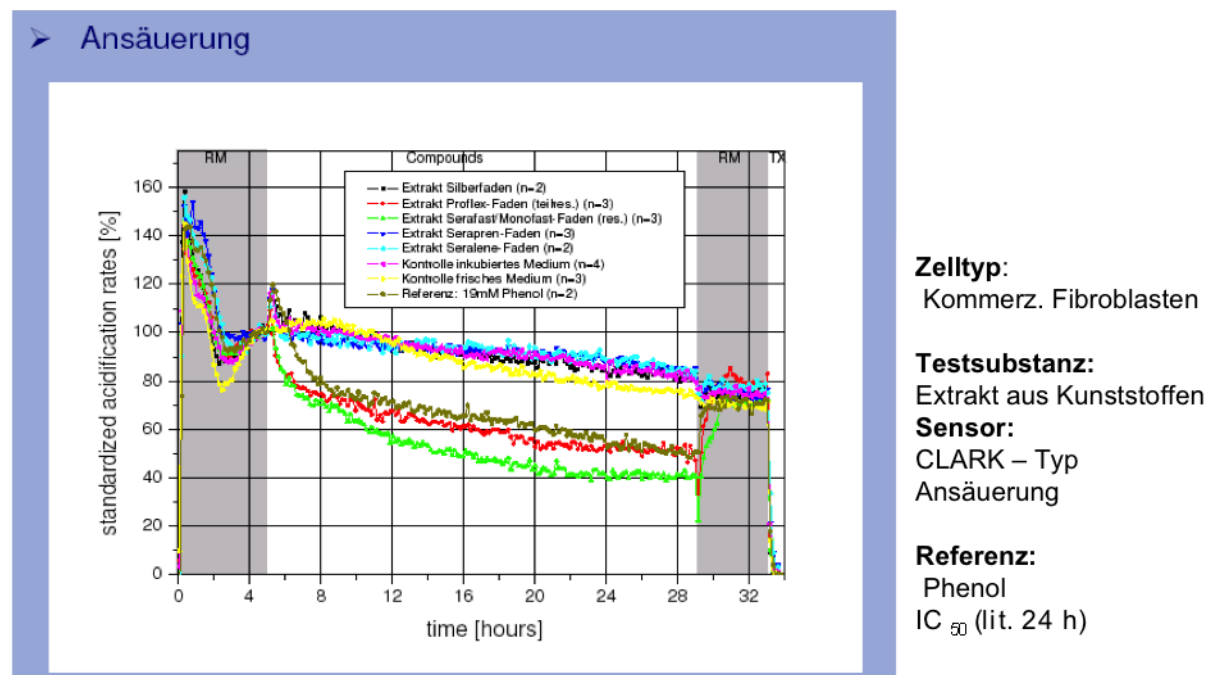


Abbildung 4.31: Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Ansäuerung;¹¹¹.

4.7 Zelladhärenz der Fibroblasten

Am Ende meiner Arbeit ist auf einer CD-ROM eine Videoaufnahme kopiert. Dabei handelt es sich um die Darstellung der Zelladhärenz der Fibroblasten am Netz TiLOOP® (pfm medical ag). Auf dem Video ist die beginnende Ausdifferenzierung der Fibroblasten am Netz zu erkennen. Diese Untersuchungen liefen über einen Zeitraum von 60 h¹⁸. In der folgenden Abbildung 4.32 ist die Entwicklung und die Adhärenz der Fibroblastenzellen am o. g. Netz in 3 Stufen zu erkennen.

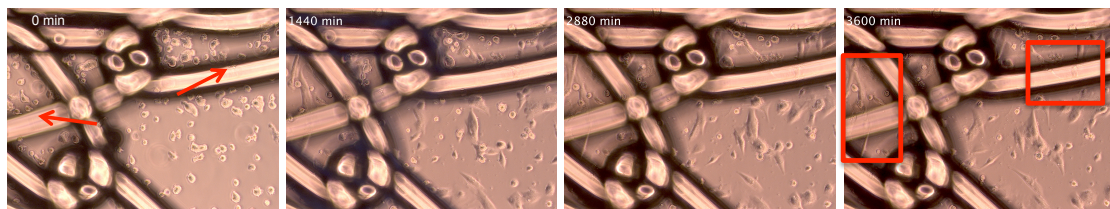


Abbildung 4.32: Entwicklung der Zelladhärenz am TiLOOP® (pfm medical ag). Dargestellt ist der Bewuchs einzelner Netzfäden mit Fibroblasten über einen Zeitraum von 60 h (siehe rote Pfeile und Einkastungen).

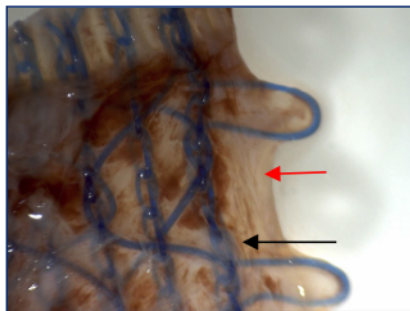
4.8 Biologisches Verhalten und klinische Anwendung

Anhand von zwei *in-vivo* Beispielen sollte in dieser Arbeit die Richtigkeit der *in-vitro* Ergebnisse praxisnah dargelegt werden. Im Anschluss wurden die *in-vivo* Resultate stereomikroskopisch, REM und histologisch dokumentiert. Das erste Material (Abbildung 4.33) stammte von einer Patientin, 69 Jahre. Bei dem Explantat handelte es sich um das nicht resorbierbare SERASIS PP (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG). Als zweites Explantat (Abbildung 4.34) stand das titanbeschichtete Netz TiMESH (pfm

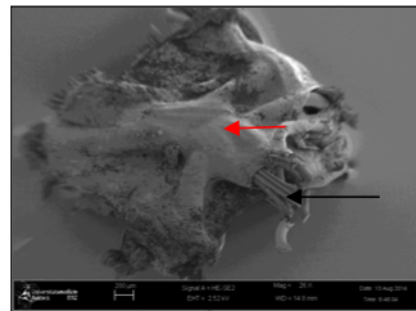
medical AG) zur Verfügung. Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Entnahme ebenfalls 69 Jahre alt. Rückblickend auf die *in-vitro* Untersuchungen zeigten die Fibroblasten eine sehr gute Zelladhärenz auf alloplastische Kunststoffe. Auch *in-vivo* war ein sehr gutes Einwachsen beider Netze mittels Sonographie zu erkennen. Das bedeutet, dass die *in-vitro* Resultate gleichermaßen in *in-vivo* verifiziert sind.

Bei dem TiMESH-Explantat wurde histologisch eine chronische Entzündung mit Nekrosen nachgewiesen. Die Nekrosenbildung entstand durch das Gefäßkoagulieren mit bipolarem Strom während der Operation. Ebenfalls trat bei dem TiMESH trotz Titanbeschichtung eine mäßiggradige, floride, granulierende Entzündung auf, welche nicht negativ zu bewerten ist. Die normale Fremdkörperreaktion könnte diese geringe Entzündung hervorgerufen haben.

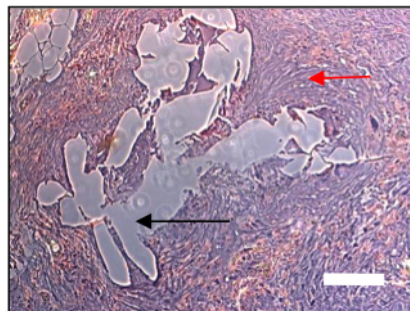
Beim SERASIS PP war keine floride Entzündung diagnostiziert worden. Ferner zeigte sich histologisch, dass das Mesh in die Körpermatrix gut integriert war.



(a) Stereomikroskopie

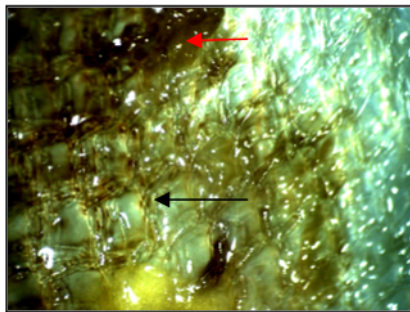


(b) REM

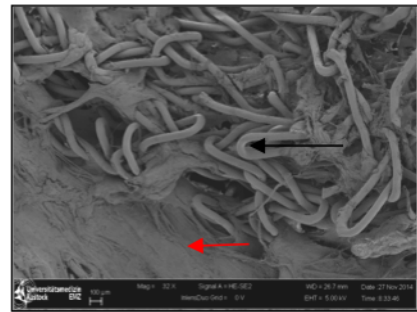


(c) Histologie (HE-Färbung)

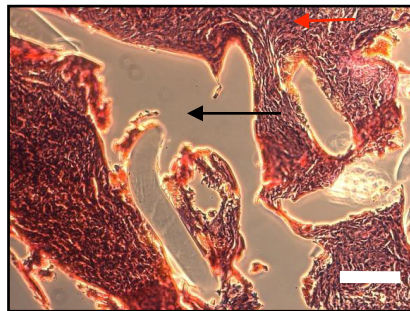
Abbildung 4.33: Explantat SERASIS PP (schwarzer Pfeil); Narbenplatte (roter Pfeil); weißer Skalierungsbalken = 250 μm .



(a) Stereomikroskopie



(b) REM



(c) Histologie (HE-Färbung)

Abbildung 4.34: Explantat TiMESH (schwarzer Pfeil); Narbenplatte (roter Pfeil); weißer Skalierungsbalken = 250 μ m.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden von mir insgesamt 19 verschiedene Netzvarianten, die derzeit in der Urogynäkologie verwendet werden, miteinander verglichen. Dabei lagen die Schwerpunkte auf Zelladhärenz, Zytotoxizität, Apoptose, Proliferation und Vitalität während Netzkontakt. Als Zellmaterial kamen zum einen kommerzielle Fibroblasten und zum anderen primäre Fibroblastzellen von betroffenen Patientinnen zum Einsatz. Bei allen *in-vitro* Untersuchungen wurde stets der Metabolismus der Zellen mit geprüft. Ein besonderer Fokus dieser Arbeit liegt darin, dass es sich bei den ausgewählten Untersuchungsmethoden nicht nur um Endpunktanalysen im Langzeitversuch (12 Wochen) handelt, sondern auch um kontinuierliche Messungen.

Außerdem wurden die so ermittelten *in-vitro* Resultate mit *in-vivo* Ergebnissen gewonnen aus zwei unterschiedlichen Explantaten in Bezug gebracht. Dadurch konnte festgestellt werden, ob sich die *in-vitro* Ergebnisse *in-vivo* widerspiegeln.

Seit vielen Jahrzehnten werden Kunststoffnetze, sogenannte Meshes, in der Bauchwandchirurgie eingesetzt. Im Jahr 1956 wurde von Usher erstmals die Verwendung eines Meshes nicht nur beschrieben, sondern auch experimentell aufgezeigt³⁹. Netze dienen zur Unterstützung von Gewebedefekten. Im Bereich des Beckenbodens sind es die Beckenbodendefekte.

Fibroblasten und deren ruhende Form, Fibrozyten, dienen sowohl der Faserbildung (Kollagene, retikuläre und elastische Fasern) unter Synthese von Grundsubstanzen (Glykosaminoglycane) als auch des Faserabbaus (Kollagenasen). Freie Bindegewebezellen stehen dagegen vorrangig im Dienst der Immunantwort. Die Aufgabe des lockeren Bindegewebes besteht auch in der Nährstoffversorgung anliegender Gewebeschichten. Das Stratum reticulare zeichnet sich durch kräftige Faserbündel vom Kollagen Typ I und durch ein Netzwerk elastischer Fasern aus. Dies gewährleistet einerseits z. B. hohe Zugfestigkeit der Haut, andererseits werden darüber die elastischen Eigenschaften vermittelt⁵³.

Früher standen Festig- und Beständigkeit für Qualität. Heute ist primär die Gewebeverträglichkeit und die Adhärenz von Fibroblasten gefragt. Zur chirurgischen Therapie von Bauchwandhernien werden heute hauptsächlich gestrickte Materialien implantiert, da insbesondere in der Narbenhernienchirurgie nur auf diese Weise die Rezidivraten nach konventioneller Fasziennaht von bis zu 50 % auf ca. 10 % reduziert wurden^{56;72;88;99}. Das Prinzip einer Netzüplantation beruht neben einer direkten mechanischen Belastbarkeit der Netze auf einer Induktion der Narbenbildung im Rahmen der Netzünkorporation. Eine Folge dieser Therapie ist das Auftreten von spezifischen Komplikationen, wie z.B. entzündliche Prozesse^{3;49;94;104}. Somit ist neben der Gewebeverträglichkeit die Adhärenz und Morphologie von Fibroblasten von Bedeutung^{54;79}.

Die weibliche Belastungsinkontinenz auf der Basis von Beckenbodenerschlaffung ist die häufigste Form der Harninkontinenz und stellt ein gesellschaftliches Gesundheitsproblem enormer Tragweite dar. Die Belastungsinkontinenz der Frau beruht u. a.

auf konstitutioneller oder altersbedingter Bindegewebe- und Muskelschwäche, Bindegewebsschädigung durch Geburten und Übergewicht. In der Pathogenese der weiblichen Stressinkontinenz wird gegenwärtig der Verlust von Bindegewebestrukturen, die die Urethra (Ligamentum pubourethrale) umgeben, favorisiert. Somit ist die Regeneration von Fibroblasten anatomisch und funktionell von zentraler Bedeutung. Es stehen heute verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die weibliche Belastungsinkontinenz operativ zu behandeln. Eine davon ist die Nutzung von Kunststoffnetzen.

Obwohl 2012 durch die FDA-Warnung das Implantieren von vaginalen Deszensusnetzen weltweit zurück ging und einige Firmen, darunter die Fa. Ethicon, ganz mit vaginalen Deszensusnetzen vom Markt verschwanden, wurden in den letzten Jahren (2013/2014) wieder zunehmend Beckenbodenrekonstruktionen mittels Netzeimplantaten durchgeführt. Europaweit ist sogar eine Steigerung zu verzeichnen. Es wurden neue Verfahren entwickelt, bei denen verschiedene Netzmaterialien zur Verstärkung der erschlafften Bindegewebestrukturen und Ligamente im kleinen Becken verwendet werden^{83;93}.

Durch verstärkte Nutzung alloplastischer Materialien in der Beckenbodenchirurgie steigen die Anforderungen an das Netzmaterial immens. Schon 1952/1953 beschrieben Cumberland und Scales in ihren Publikationen das ideale Netzmaterial. Es sollte chemisch und physikalisch neutral, nicht kanzerogen, mechanisch belastbar, sterilisierbar sein und weder Allergien noch inflammatorische Reaktionen hervorrufen^{14;84;85}. Inzwischen liegt für das optimale Netz ein weitaus höherer Standard vor²³. Die gegenwärtig verwendeten synthetischen Materialien sind nicht toxisch, aber aufgrund ihrer Mikrostrukturen treten immer wieder postoperative Komplikationen auf. Hauptsächlich

handelt es sich dabei um Erosionen, Infektionen, Schmerzen und selten Serombildung, die dann zu Explantationen führen.

Schwerpunkte der Implantatentwicklung sind Materialbeschaffenheit und Gewebeverträglichkeit. Große Bedeutung für die Gewebeverträglichkeit der implantierten Kunststoffe hat die Porengröße und die Fadenstruktur. Für die operative Praxis werden momentan verstärkt monofile und großporige Materialien empfohlen. Diese monofilen Materialien haben eine geringere Komplikationsrate als multifile Netze. Durch große Poren können Makrophagen besser eindringen und die Bildung eines Bakterienfilms verhindern. Außerdem wird das Einwachsen des Netzes in das körpereigene Gewebe erleichtert und wirkt damit der Erosionsbildung entgegen^{18;84}. Multifile Kunststoffe besitzen zwar eine große Weichheit, aber führen öfter wegen ihrer Oberfläche zu Infektionen und zu ausgeprägten Fremdkörperreaktionen. Aktuell werden aufgrund guter Gewebeverträglichkeit Netze und Bänder aus PP empfohlen⁷⁶.

Die optimalen Eigenschaften für textile Netze sind im Abschnitt 1.1.4 schon erwähnt worden. Ein derzeit verwendetes Netz sollte die in Tabelle 5.1 aufgeführten Eigenschaften aufweisen.

Tabelle 5.1: Eigenschaften von heutigen Netzen

- | | |
|-----------------------|---------------------|
| • leichtgewichtig | • monofil |
| • gut Druck belastbar | • großporig |
| • nicht schrumpfend | • gut implantierbar |
| • elastisch | • gut zuschneidbar |
| • gut verträglich | |

In dieser Arbeit wurden humane Fibroblasten mit und ohne Kunststoffe auf Morphologie, Adhärenz und Verträglichkeit erstmals in einem Langzeitversuch über 12 Wochen Inkubation geprüft. Schon 2002 wurde von M. Duchrow et al., das Wachstumsverhalten der Fibroblasten auf Polypropylennetzen beschrieben. Sie stellten in ihren Untersuchungen eine kontinuierliche Vitalität von $\geq 95\%$ fest²². Während der vorliegenden Studie waren die Fibroblasten in den Testansätzen morphologisch gut differenziert. Auch in den Untersuchungen betrug die Vitalität der Zellen zu jederzeit $\geq 95\%$. Hierfür wurde die Lichtmikroskopie, zum einen zur Lebendzellzahlermittlung und zum anderen zur Beurteilung der Zelldifferenzierung, genutzt. Um individuelle Veränderungen nachweisen zu können, müssen die Zellen einer Konfokaler-Laserraster-Mikroskopie unterzogen werden. Solche Untersuchungen wurden von Brunette et al. schon 2001 durchgeführt¹⁰. Sie entdeckten, dass Fibroblasten eine rundliche Form annehmen, wenn sie auf rauer Oberfläche wachsen. In den vorliegenden lichtmikroskopischen Analysen konnte diese Änderung der Zellmorphologie nur in dem SERAMESH LE-Netz (nicht resorbierbares PP-Netz) von der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG bestätigt werden. Oft sind die Materialien mit Metallveredelungen rau an ihrer Oberfläche. Diese rundliche Formveränderung der Zellen führt laut Eisenbarth (1996) zur schlechteren Adhärenz²⁶. Davon abgeleitet sind die Herstellungsverfahren der beschichteten Materialien von immenser Bedeutung. Auch die Konzentration der Metalle (Titan und Silber) ist ausschlaggebend für eine gute Zelladhärenz, damit ein gutes Einwachsen des Netzes in die Körpermatrix gesichert wird^{77;80}.

Die Prüfung auf Vitalität und Proliferation der Zellen bei Netzkontakt zeigte, dass nach Versuchsablauf die Zellen bei allen Netzformen um das 10fache proliferierten. Zwischen den Materialien entstanden große Konzentrationsunterschiede. M. Duchrow

et al. (2002) wiesen in ihren Ansätzen mit und ohne PP-Netz nur einen geringen Unterschied bezüglich der Proliferation nach. Er verzeichnete teilweise sogar einen Rückgang des Zellwachstums um 4 % bei Mesh-Kontakt²². Das konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Sowohl bei den PP-Netzen, als auch bei den PVDF-Meshes wurde ein größerer Zellbewuchs ersichtlich. Als Vergleich diene dabei die Proliferation der Zellen ohne Netzkontakt. Eine Ursache für die Proliferationssteigerung könnten die Versuchsbedingungen sein. Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine *in-vitro* Langzeitstudie von 12 Wochen. Bei den titan- und silberbeschichteten Materialien kam es zu einer deutlich höheren Proliferation, als bei reinen synthetischen Kunststoffen (PP und PVDF). Park et al. hatte schon 1992 in seiner Publikation den gebildeten, stabilen Titanoxidfilm als „sehr adhäsiv“ bezeichnet, d. h. eine Titanlegierung fördert den Bewuchs der Netze. Silber zählt ebenfalls zu den Edelmetallen, das durch eine starke Resistenz gegenüber Korrosion und Oxidation gekennzeichnet ist⁹⁵. Silber zeichnet sich durch eine hohe antiseptische Eigenschaft aus, daher werden Silbernetze bei bakteriellen Entzündungen eingesetzt. In den teilresorbierbaren Materialien war eine Proliferation zu erkennen, jedoch wies das Zellwachstum im Vergleich zum Kontrollansatz (Fibroblasten ohne Netzkontakt) einen geringeren Prozentsatz auf. Das ist eine Folge dessen, dass die Materialien nach der Inkubationszeit teilweise stoffreduziert vorlagen. Der resorbierbare Anteil, an dem die Zellen zunächst haften, war zum Teil bzw. vollständig nach 12 Wochen Inkubation physiologisch abgebaut (siehe Abbildung 4.2). Diese Resultate wurden durch die kontinuierlichen Messungen am Bionas® 2500 analyzing system erhärtet (siehe Abschnitt 4.6).

Die Gewebverträglichkeit schloss mehrere biochemische Untersuchungen wie Toxizität und Proliferation ein. Gleichzeitig liefen ständig während der Inkubation mit

den verschiedenen Netzmaterialien Messungen zum Metabolismus der Fibroblastzellen. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob die Zellen mit Netzkontakt zusätzlich chemische Reaktionen mit den Kunststoffen, insbesondere mit den Veredelungen Titan/Silber, eingehen, bei denen toxische Substanzen freigesetzt werden, die dann zu Komplikationen führen. Laut Merkel (2008) entsteht durch Titan im Gewebe eine Oxidschicht, die sich nicht bzw. kaum auflöst und somit vor toxischen Reaktionen schützt⁶⁵. Auch Bártolo hat 2008 die sich bildende Titanoxidschicht an den titanbeschichteten Materialien als inaktiv beschrieben⁶. Diese Oxidschicht ist stabil und zieht sich als dünner Film über das jeweilige Metall und verhindert damit die Korrosion⁷⁰. Die Ergebnisse in dieser Studie bestätigen die Aussagen von Merkel und Bártolo.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Metabolismus der Zelle mit und ohne Mesh-Kontakt (un- und beschichtete Materialien) durchgeführt. Auffallend sind dabei die Ergebnisse der pH-Werte. Hierbei zeigte sich, dass weder bei Netzen mit Metallbeschichtungen, noch bei reinen synthetischen Materialien, Ionen freigesetzt wurden, die eine Reaktion hervorriefen und sich negativ auf den Zellstoffwechsel der Fibroblasten auswirkten. Nur bei den resorbierbaren und teilresorbierbaren Netzen konnte eine größere pH-Wertänderung analysiert werden. Es kam zur Ansäuerung. Dieses Ansäuern beruht auf der Bildung von Milchsäure beim Abbau der resorbierbaren Stoffe. *In-vivo* wird die entstandene Milchsäure physiologisch abtransportiert und stellt daher keinen Faktor für Komplikationen dar. Die Nutzung von resorbierbaren Netzen wurde aus Stabilitätsgründen in der Urogynäkologie eingestellt¹².

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den Glukoseanalysen ermittelt. Die minimalen Veränderungen der Glukosewerte während der Ansätze sprechen für eine gute Biokompatibilität.

Ebenfalls bestätigen die Ergebnisse der Toxizität, Proliferation und Vitalität, dass die verwendeten Materialien keine negativen Reaktionen *in-vitro* zeigten, die sich schädigend auf das Zellmaterial auswirken.

Auch die Untersuchungen zum pharmakodynamischen Verhalten verschiedener Materialien an humanen Fibroblasten vervollständigten die bisherigen Erkenntnisse über das Adhärenzverhalten der Fibroblasten auf unterschiedlichen Materialien (nicht-, teil- und resorbierbar; un- und beschichtet) und Oberflächenstrukturen. Dafür wurden drei Parameter getestet. Es gelang am Bionas® 2500 analyzing system Aussagen über die Zellatmung, -impedanz und -ansäuerung zu bekommen. Das Bestimmen der physiologischen Effekte war besonders ausschlaggebend, weil es es sich dabei nicht nur um Endpunktbestimmungen, sondern um kontinuierliche Messungen über einen längeren Zeitraum handelte. Im Ergebnis stand fest, dass die Zelladhärenz der nicht resorbierbaren und metallbeschichteten Materialien den Zellmetabolismus nicht beeinflussen. Aber bei den teilresorbierbaren Kunststoffen lag eine signifikante Beeinflussung vor, die jedoch reversibel war.

Durch die Positivität des p53-Tumorsuppressorgens und durch die FACS-Analysen konnte bewiesen werden, dass durch Netzkontakt in den Fibroblasten kein induzierter Zelltod ausgelöst wurde. Auch das Vorhandensein des Ki67- Proliferationsfaktors in den Fibroblasten mit Netzkontakten spricht ebenfalls für eine gute Biokompatibilität der getesteten Kunststoffe.

Der Fokus bei allen Untersuchungen war das Zellverhalten zu Porengröße, Filamentenstruktur und stofflicher Zusammensetzung der Netze. Die *in-vitro* Ergebnisse, spe-

ziell die Licht- und Rasterelektronenmikroskopie haben gezeigt, dass der Bewuchs mit Zellen am PP gegenüber anderen Materialien, wie z. B. PVDF, günstiger ist. Eine besonders gute Zelladhärenz war bei den Metallveredelungen (Titan/Silber) zu finden. Diese Resultate wurden auch molekularbiologisch und durch FACS-Analysen bestätigt.

Hinsichtlich der Porengröße ergab sich ein sehr gutes Zellwachstum bei einer Porengröße von $\geq 1\text{mm}$. Darunter führt zu schlechterem Andocken der Zellen in das gemaschte Material. Untersucht wurden zwei großporige (SERAMESH LE / SERAMESH UL) und zwei kleinporige (SERAMESH SE / SERAMESH SO) Netze. Die großporigen Netze wiesen eine sehr gute Zelladhärenz auf. Das kleinporige SERAMESH SE zeigte ebenfalls eine gute Adhärenz. Dies ist eine Folge dessen, dass dieses Netz eine große Rauigkeit besitzt. Diese große Rauigkeit bot viel Halt für Zellen. Die Aussage von Eisenbarth (1996)²⁶, dass es bei rauen Netzen zu einer schlechten Zelladhärenz kommt, konnte in dieser Studie widerlegt werden.

Aufgrund dessen, dass in dieser Studie sowohl Netze mit monofiler (SERAMESH UL / SERAMESH SO), als auch multifiler (SERAMESH LE / SERAMESH SE) Filamentenstruktur verwendet wurden, konnten Aussagen über die Beschaffenheit der Filamente getroffen werden. Die Aussage über die bevorzugte Nutzung von monofilen Produkten in der Praxis hat sich in den vorliegenden *in-vitro* Untersuchungen größtenteils bestätigt^{16;41;87}. Allerdings konnte bei dem multifilen SERAMESH LE auch eine sehr gute Zelladhärenz dokumentiert werden, welches durch die gute Verknüpfung der Filamente untereinander zustande kam. Dieses Resultat sollte zukünftig noch weiter verfolgt werden.

Junge et al. (2007) plädierten in der Hernienchirurgie für leichtgewichtige Kunststoffnetze. Das Gewicht beeinflusst die Strukturintegrität. Außerdem zeichnet sich ein leichtgewichtiges Netz gegenüber einem schwergewichtigen Netz durch eine geringere Fremdkörperreaktion aus⁴⁴. Dies gilt auch in der Urogynäkologie. Allerdings benötigt das urogynäkologische Netz eine besondere Randverstärkung, damit es nicht verrutscht bzw. sich aufrollt, denn damit wäre die Haltefunktion eingeschränkt oder sogar aufgehoben, was schließlich zur Explantation führt.

Anhand von zwei Beispielen aus der urogynäkologischen Praxis wurde gezeigt, wie die *in-vitro* Resultate *in-vivo* reflektiert werden. Es konnte bildlich stereo- und raster-elektronenmikroskopisch dokumentiert werden, wie hervorragend sich ein PP-Netz in die Körpermatrix integrierte. Die histologische Aufarbeitung der Explantate bestätigte dieses ebenfalls.

Die positiven Nachweise von ER α und PR, stellen neue innovative Ansätze dar. Ein Ansatz wäre die Tatsache, dass durch Hormonersatztherapie eventuell Atrophien des Urogenitalbereiches verhindert werden. Das lässt auf neue Therapien hoffen. So könnten Netze mit lokaler Freisetzung von supportiven Substanzen entwickelt werden, die nicht nur entzündungshemmend wirken, sondern auch zur Regeneration der geschädigten Fibroblasten führen, d.h. die Adhärenz und die Neubildung von Zellen unterstützen^{96;97}. Dafür allerdings müssen weiterführende Detailuntersuchungen folgen.

Ein weiterer Ansatz wäre im Bereich des Formdesign. So könnten durch neue Biomaterialien oder durch neue Knüpftechniken das Aufrollen der Bänder und Netze während der Implantation und des Einwachsens vermieden werden. Auch die Beschaffenheit zukünftiger Materialien könnte dahin verbessert werden, dass das Anhaften bzw. Ando-

cken der Zellen an das Netzgeflecht günstiger wird. Eine Möglichkeit wäre z. B. die Rauigkeit der Netzgeflechte zu verändern.

Die *in-vitro* Ergebnisse ergaben insgesamt viele neue Erkenntnisse über das Zellverhalten an verschiedenen Biomaterialien. Nur so ist es möglich, neue verbesserte Materialien zu entwickeln. Um eine optimale Versorgung der Patientinnen zu ermöglichen, ist es unabdingbar weiterhin klinische Forschung hinsichtlich der Materialfrage und Gewebeverträglichkeit durchzuführen.

Jedoch sind nicht nur die chemischen und physikalischen Eigenschaften der alloplastischen Netze verantwortlich für einen positiven Verlauf der urogynäkologischen Operationen. Bevor alloplastisches Material in der Beckenbodenchirurgie eingesetzt wird, muss immer eine korrekte Diagnosestellung erfolgen und andere Therapiemöglichkeiten geprüft werden. Obwohl inzwischen gute Langzeitergebnisse besonders in der Netzchirurgie vorliegen, sollte der Einsatz von Kunststoffen intensiv überdacht werden. Das Verwenden von Kunststoffen in der operativen Medizin löst immer eine Fremdkörperreaktion aus. In welchem Ausmaß Komplikationen auftreten, ist abhängig vom Material und natürlich auch von der operativen Erfahrung des Operateurs⁸⁴. Ebenfalls ist die genutzte Technik des Operateurs ein wichtiger Faktor für den positiven Ausgang einer Netzimplantation. Beim häufigen Anwenden von bipolarem Strom kommt es zur verstärkten Gefäßkoagulation. Dabei kann die kontinuierliche Durchblutung des umgebenden Gewebes gestört werden und eine vermehrte Serom- oder Nekrosenbildung ist die Folge. Studien haben gezeigt, dass durch Nutzung verschiedener Operationstechniken die Anzahl der Komplikationen sehr unterschiedlich ist (3. Operativer Expertenworkshop für Mammachirurgie, 2015). Die prozentuale Auswertung liegt je nach Operationstechnik zwischen 3,9 % -14,8 %.

Zurzeit gibt es eine Vielfalt an alloplastischen Materialien, die gute Eigenschaften hinsichtlich der Gewebeverträglichkeit aufweisen. Jedoch ist kein Favorit darunter zu finden. Welches Implantat für welche Patientin am idealsten geeignet ist, hängt immer von der Gewebebeschaffenheit der Patientin ab und muss individuell festgelegt werden.

Ein weiterer wesentlicher Schwerpunkt in der textilen Netzimplantation ist die genaue Aufklärung der betroffenen Patientinnen. Seit den Sicherheitshinweisen der FDA 2011 sind viele Betroffene beunruhigt, wenn es um einen Mesh-Einsatz geht. Sie fühlen sich oft schlecht informiert. Hier ist noch viel Aufklärungsarbeit von Seiten des Mediziners nötig¹⁷.

Im Hinblick auf die Resultate der vorliegenden Arbeit sind folgende Kernaussagen hervorzuheben:

- Erst Langzeitversuche und pharmakodynamische Messungen zeigen die medizinisch relevanten Auswirkungen.
- PP spricht für eine sehr gute Gewebeverträglichkeit.
- Teilresorbierbare Polymere haben den Vorteil, dass durch ihre Stoffreduzierung eine geringere Fremdkörperreaktion ausgelöst wird.
- Metallveredlungen führen zu einem schnelleren Bewuchs und damit zur schnelleren Integration in die Körpermatrix.
- Durch Titan- und Silberbeschichtung kann eine eventuelle Kontamination verhindert werden.

- Die vorliegenden Untersuchungen haben zur Entwicklung eines neuen Silbernetzes geführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die auf der Grundlage der guten Zusammenarbeit der Forschung mit Klinik und Industrie entstanden sind, bilden die Basis für eine zeitnahe Translation neuer verbesserter Netzvarianten in die Praxis, damit betroffene Patienten davon zukünftig profitieren können.

Literaturverzeichnis

1. AACHEN, PATHOLOGIE UK: *Arbeitsprinzip EDX7*.
2. ABRAMS, PAUL, LINDA CARDOZO, MAGNUS FALL, DEREK GRIFFITHS, PETER ROSIER, ULF ULMSTEN, PHILIP VAN KERREBROECK, ARNE VICTOR und ALAN WEIN: *The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society*. Urology, 61(1):37–49, 2003.
3. AMID, P. K.: *Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery*. Hernia, 1(1):15–21, 1997.
4. AUMÜLLER, GERHARD. In: *Anatomie: 208 Tabellen; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]*. Georg Thieme Verlag, 2007.
5. BARKER, KATHY: *Das Gold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger*. Springer Spektrum, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
6. BÁRTOLO, P. J. und B. BIDANDA: *Bio-Materials and Prototyping Applications in Medicine*. Springer US, 2007.

7. BÄTJE, M.: *Glycodelin A - Genexpression und Proteinnachweis im Gewebe beim Ovarialkarzinom*. Doktorarbeit, Universitätsmedizin Rostock, Universität Rostock, 2009.
8. BAUMANN, O.: *Vaginaler Mesh-Repair unter Verwendung transobturatoriell und transischiorectal implantierter Polypropylen-Interponate bei Genitaldescensus und Harninkontinenz*. Doktorarbeit, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Ruhr-Universität Bochum, 2007.
9. BRAYBOOK, JULIAN H.: *Biocompatibility assessment of medical devices and materials*. John Wiley & Sons, 1997.
10. BRUNETTE, D. M.: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications*. Springer, 2001.
11. CATTORETTI, GIORGIO, MICHAEL H. G. BECKER, GÖRAN KEY, MICHAEL DUCHROW, CARSTEN SCHLÜTER, JÜRGEN GALLE und JOHANNES GERDES: *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections*. The Journal of Pathology, 168(4):357–363, 1992.
12. COTZIAS, C und J GIRLING: *Uterine compression suture without hysterotomy –why a non-absorbable suture should be avoided*. Journal of Obstetrics & Gynaecology, 25(2):150–152, 2015/04/03 2005.
13. CUEVAS, E., D. B. JONES und D. H. WRIGHT: *Immunohistochemical detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues*. The Journal of Pathology, 169(4):477–478, 1993.

14. CUMBERLAND, V.H.: *A preliminary report on the use of prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia*. The Medical Journal of Australia, 1(5):143—144, February 1952.
15. DANNECKER, CHRISTIAN, VERONIKA WOLF, RENATE RAAB, HERMANN HEPP und CHRISTOPH ANTHUBER: *EMG-biofeedback assisted pelvic floor muscle training is an effective therapy of stress urinary or mixed incontinence: a 7-year experience with 390 patients*. Archives of Gynecology and Obstetric, 273(2):93–97, 2005.
16. DENNINGER, F., E. GIESE, H. OSTERTAG und A. SCHENEK: *Textil- und Modalexikon*. Dt. Fachverlag, 2006.
17. DESSIE, SYBIL G., MICHELE R. HACKER, MIRIAM J. HAVILAND und PETER L. ROSENBLATT: *Attitudes toward transvaginal mesh among patients in a urogynecology practice*. International Urogynecology Journal, Seiten 1–9, 2015.
18. DIETERICH, M., J. STUBERT, B. GERBER, T. REIMER und D. U. RICHTER: *Bio-compatibility, cell growth and clinical relevance of synthetic meshes and biological matrices for internal support in implant-based breast reconstruction*. Archives of Gynecology and Obstetric, DOI 10.1007/s00404-014-3578-9, 2014.
19. DIMPFL, T, A SZYCH, J-P JANTZEN, K BADER und W BADER: *Belastungsinkontinenz und Deszenzus*. Der Gynäkologe, 43(8):653–663, 2010.
20. DOERR, H.W. und W.H. GERLICH: *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. Thieme, 2 Auflage, 2010.
21. DORAK, M.T.: *Real-Time PCR*. Advanced Methods. Taylor & Francis, 2006.

22. DUCHROW, M., U. WINDHÖVEL, T. BETHGE, O. SCHWANDNER, U. MARKERT, H. P. BRUCH und R. BROLL: *Kunststoffnetze aus Polypropylen beeinflussen das Wachstum humaner Zellen in vitro: Eine experimentelle Studie*. 73(2):154–160, 2002.
23. DUERR, S., S. LYER, J. MANN, D.U. RICHTER, R. TIETZE, E. SCHREIBER und C. ALEXIOU: *Characterization of nanoparticles functionalized with a chemotherapeutic substance in cell culture – basic investigations for Magnetic Drug Targeting*. J Biomed Eng, 2011.
24. EGGER, B., J. FAWCETT und B.L. DOWLING: *Use of skin staples for securing the mesh in the Lichtenstein repair of inguinal hernia*. Ann. R. Coll. Surg. Engl., 78:63–64, 1996.
25. EGGERT, F.: *Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse: mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop ; ein Handbuch für die Praxis*. Books on Demand, 2005.
26. EISENBARTH, E., J. MEYLE, W. NACHTIGALL und J. BREME: *Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts*. Biomaterials, 17(14):1399 – 1403, 1996.
27. E.V., FORUM MEDTECH PHARMA: *Netzwerk für Innovationen*.
28. FERZLI, GEORGE S., AZIZ MASSAD und PETER ALBERT: *Extraperitoneal Endoscopic Inguinal Hernia Repair*. Journal of Laparoendoscopic Surgery, 2(6):281–286, 2015/04/03 1992.
29. FISCHER, A, T FINK, S. ZACHMANN und H. ASHOUR: *Zur Materialfrage in der Implantatchirurgie des Deszensus: Vergleich zwischen Polypropylenvlies dermalen*

- porciner azellulärer Kollagenmatrix unter Berücksichtigung der Erfahrung nach 7 Jahren Anwendung von Implantaten.* Journal für Urologie und Urogynäkologie, 11(4):19–24, 2004.
30. FRANZEN, KARIN, GUNNEL ANDERSSON, JENNY ODEBERG, PATRIK MIDLÖV, EVA SAMUELSSON, KARIN STENZELIUS und MARGARETA HAMMARSTRÖM: *Surgery for urinary incontinence in women 65 years and older: a systematic review.* International Urogynecology Journal, Seiten 1–8, 2014.
31. GAILUS, S.: *Signaltransduktion am Estrogenrezeptor.* Diplomarbeit, Universitätsmedizin Rostock und Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock, 2006.
32. GAUGLITZ, G. und T. VO-DINH: *Handbook of Spectroscopy.* Wiley-VCH, 1. Auflage, 2003.
33. GAURUDER-BURMESTER, A.: *Netze in der Beckenbodenchirurgie.* Der Gynäkologe, 1:13–14, 2011.
34. GMBH, CRB ANALYSE SERVICE: *Röntgenmikroanalytik und Bilderzeugung.*
35. GOESCHEN, K. und P.E.P. PETROS: *Der weibliche Beckenboden: Funktionelle Anatomie, Diagnostik und Therapie nach der Integraltheorie.* Springer Berlin Heidelberg, 2009.
36. GRADY, DEBORAH, JEANETTE S BROWN, ERIC VITTINGHOFF, WILLIAM AP-PLIGATE, EDWARD VARNER, THOMAS SNYDER, HERS RESEARCH GROUP et al.: *Postmenopausal hormones and incontinence: the heart and estrogen/progestin replacement study.* Obstetrics & Gynecology, 97(1):116–120, 2001.

37. GSTRANTHALER, G. und T. LINDL: *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Springer Berlin Heidelberg, 6 Auflage, 2013.
38. HARTEN, ULRICH: *Physik Für Mediziner: Eine Einführung*. Springer-Lehrbuch. Springer, 2006.
39. HEAD, R.C.: *Milestones in the history of hernia surgery: Prosthetic repair*. *Hernia*, 8(1):8–14, February 2004.
40. HEIN, S.: *Stimulation von humanen Karzinomzelllinien des Endometriums mit Leinsamenrohextrakt, Lignanen sowie deren Metaboliten und der Effekt auf das Wachstumsverhalten und die Zytotoxizität*. Doktorarbeit, Universitätsfrauenklinik, Universitätsmedizin Rostock, Universität Rostock, 2015.
41. HOFER, ALFONS: *Stoffe Band. 1: Textilrohstoffe, Garne, Effekte*. Frankfurt am Main: Schriftenreihe der Textil-Wirtschaft, 1992.
42. HOLNESS, C.L. und D.L. SIMMONS: *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to*. *Blood*, 81(6):1607–1613, 1993.
43. HOUIS, S, F SIEGMUND, M BARLE und T GRIES: *Bioresorbierbare Textilien für medizinische Anwendungen*. *Technische Textilien*, 50(4):294, 2007.
44. JUNGE, K., M. BINNEBÖSEL, R. ROSCH, A.P. ÖTTINGER, U. KLINGE und V. SCHUMPELICK: *Einfluß von Netzmaterialien auf die Strukturintegrität des Ductus deferens und Hodenfunktion nach Leistenhernienreparation*. In: 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie-Meeting Abstracts, <http://www.egms.de/en/meetings/dgch2007/07dgch129.shtml>, October

2007. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, German Medical Science GMS Publishing House.
45. KAPOOR, DHARMESH S., G. WILLY DAVILA, RAUL J. ROSENTHAL und GAMAL M. GHONIEM: *Pelvic Floor Dysfunction in Morbidly Obese Women: Pilot Study*. Obesity Research, 12(7):1104–1107, 2004.
46. KASPAR, C. und A. BURZLAFF: *Application of Flow Cytometry for in vitro Testing*. Bioforum International, Seiten 204–206, 2002.
47. KBV: *Wirkstoff Aktuell: Duloxetine (Cymbalta)*.
48. KEIM, S. und C. ANTHUBER: *Inkontinenz und Deszensus der jungen Frau*. Der Gynäkologe, 43(8):643–652, 2010.
49. KLINGE, U., J. CONZE, B. KLOSTERHALFEN, W. LIMBERG, B. OBOLENSKI, A. P. ÖTTINGER und V. SCHUMPELICK: *Veränderung der Bauchwandmechanik nach Mesh-Implantation: Experimentelle Veränderung der Mesh-Stabilität. (Alteration of abdominal wall mechanics after mesh implanation. Experimental alteration of mesh stability)*. Langenbecks Archiv für Chirurgie, 381(6):323–332, 1996.
50. KÖLBL, H und L BECK: *Urogynäkologie*. Der Gynäkologe, 40(9):671, 2007.
51. KONDO, T., S. TAKAHASHI, H. SATO, M. YAMADA, T. KIKUCHI und K. FURUYA: *Cytotoxicity of size-density fractionated coal fly ash in rat alveolar macrophages cultured in vitro*. Toxicology in Vitro, 7(1):61 – 67, 1993.
52. KOOLMAN, J., K.H. RÖHM und J. WIRTH: *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme flexibook. Thieme, 3 Auflage, 2003.

53. KORENKOV, M., S. SAUERLAND, A. PAUL und E. A. M. NEUGEBAUER: *Die Deutsche Narbenhernienchirurgie im Umbruch. Ein Vergleich zweier Kliniksumfragen*, Band 2002, Seiten 195–196. Springer Berlin Heidelberg, 2002.
54. KUNERT-KEIL, C., T. GREDES, D.U. RICHTER, M. SZYBA, M. DOMINIAK und T. GEDRANGE: *The survival and proliferation of fibroblasts on ceramic implants: an in-vitro study*. Biomed. Tech., 57(1):11–15, 2012.
55. LABS, W.: *Kritische Punkttrocknung (Critical Point Drying)-Protokoll*. EMZ Universität Rostock, 2009.
56. LANGER, C., P. SCHWARTZ, P. KRAUSE, H. MOHAMMADI, B. KULLE, A. SCHAPER, L. FÜZESI und H. BECKER: *Hernienchirurgie: Wachstumsverhalten humaner Fibroblasten auf alloplastischen Kunststoffnetzen*. 76(9):876–886, 2005.
57. LIEDL, B., I. SCHORSCH und C. STIEF: *Fortentwickelte Konzepte zur weiblichen (In-) Kontinenz*. Der Urologe, 44(7):803–820, 2005.
58. LINDHE, J., N.P. LANG und T. KARRING (Herausgeber): *Clinical peridontology and implant dentistry*. Blackwell Munksgaard, a Blackwell Publishing company, 4 Auflage, 2003.
59. LUTTMANN, W.: *Der Experimentator: Immunologie*. Der Experimentator. Springer, 3 Auflage, 2009.
60. MARCHIONNI, M, GL BRACCO, V CHECCUCCI, A CARABANEANU, EM COCCIA, F MECACCI und G SCARSELLI: *True incidence of vaginal vault prolapse*.

- Thirteen years of experience.* The Journal of reproductive medicine, 44(8):679—684, August 1999.
61. MARTIN, ANGELA und MARTIN CLYNES: *Acid phosphatase: Endpoint for in vitro toxicity tests.* 27(3):183–184, 1991.
62. MAZUR, P. AND: *Freezing of living cells: mechanisms and implications.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 247(3):C125–C142, 09 1984.
63. MELZIAN, F.: *Untersuchung physiologischer Effekte mit primären Fibroblasten an Nahtmaterialien.* Universitätsfrauenklinik, Universitätsmedizin Rostock, 2010.
64. MEMON, M.A., D. RICE und J.H. DONOHUE: *Laparoscopicherniorraphy.* Am. J. Coll. Surg., 184:325, 1997.
65. MERKEL, M. und K.H. THOMAS: *Taschenbuch der Werkstoffe.* Fachbuchverl. Leipzig im Carl-Hanser-Verlag, 2008.
66. MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN und H. ERLICH: *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 51(Pt. 1):263–273, 1986.
67. NAILA, SERAG-WIESSNER KG: *Nahtmaterial-Fibel*, 2004.
68. NETTER, F.H.: *Atlas der Anatomie des Menschen.* Thieme-Verlag, 2. Auflage, 1999.
69. NIESEL, A., D.U. RICHTER und D. WATERMANN: *Mechanische Aspekte von verschiedenen Polypropylenimplantaten in der Harninkontinenzchirurgie.* Gebfra, 70:887–893, 2010.

70. PARK, J. und R. S. LAKES: *Biomaterials: An Introduction*. Springer, 2007.
71. PETROS, P.E.P.: *The Female Pelvic Floor: Function, Dysfunction and Management According to the Integral Theory*. Springer, 2006.
72. PIZOFERRATO, A., A. VESPUCCI, G. CIAPETTI und S. STEA: *Biocompatibility testing of prosthetic implant materials by cell cultures*. *Biomaterials*, 6(5):346 – 351, 1985.
73. RAFFAEL, A.: *Analytical Flow Cytometry - Basic Principles*. *Labormedizin*, 11:89–97, 1988.
74. REIMER, LUDWIG und GERHARD PFEFFERKORN: *Raster-Elektronenmikroskopie*. Springer, 1973.
75. RICHTER, D.U.: *Untersuchungen zu Expressionen von Thomsen-Friedenreich-, MucinI-Antigen und Apoptosemarkern in der Normal- und Abortplazenta und in der Trophoblastzelle*. Doktorarbeit, Universitätsmedizin Rostock und Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock, 2004.
76. RICHTER, D.U., B. GERBER, E. HARMS und S. PAEPKE: *In-vitro und in-vivo Untersuchungen an einem Polypropylen-Mesh im Hinblick auf die klinische Anwendung in der Mammarekonstruktion*. *Journal of Functional Materials, Biomechanics, and Tissue Engineering*, 14(Suppl. 1), 2013.
77. RICHTER, D.U., B. GERBER, L. JONAS, V. BRIESE und C. ALEXIOU: *Physiological Behaviour of different Suture Materials on human Cells (Fibro-, Osteoblasts and Tracheal Cells)*. *Biomed. Tech.*, 55(S1):DOI 10.1515/BMT.2010.522, 2010.

78. RICHTER, D.U., B. GERBER, L. JONAS, V. BRIESE, M. SCHULZE, S. DRECHSLER und C. ALEXIOU: *Physiologische und pharmakodynamische Effekte mit Nahtmaterialien an humanen Fibroblasten*. In: PAU, H.-W. (Herausgeber): *Technik für Lebensqualität–Biomaterialien und Implantate in der HNO-Heilkunde*, Seite 213. Rheinware Verlag, Mönchengladbach, ISBN: 978-3-93897531-8, 2009.
79. RICHTER, D.U., B. GERBER, C. RICHTER, W. LABS, M. LAUE, V. BRIESE und C. ALEXIOU: *Suture materials and their influence on the growth behavior of tumor and normal cell lines*. J Biomed Eng, 56(S1), 2011.
80. RICHTER, D.U., M. LAUE, B. GERBER, V. BRIESE und C. ALEXIOU: *Eine in-vitro-Studie mit neuen beschichteten Nahtmaterialien an humanen Fibroblasten für die Kopf-, Hals- und Gesichtschirurgie*. In: GAHR, R.-H. (Herausgeber): *Kommunikation, Konsens und Kooperation*, Seiten 75–76. ISBN: 978-3-00-032142-9, 2010.
81. ROCHE APPLIED SCIENCE: *Nucleic Acid Isolation and Purification*, 4 Auflage, 2005.
82. RODEHEAVER, G.T., J.G. THACKER und R.F. EDLICH: *Mechanical performance of polyglycolic acid and polyglactin 910 synthetic absorbable sutures*. Surgery, Gynecology & Obstetrics, 153(6):835–841, December 1981.
83. ROSCH, R, K JUNGE, A SCHACHTRUPP, U KLINGE, B KLOSTERHALFEN und V SCHUMPELICK: *Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model*. European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes, 35(3):161—166, 2003.

84. SAMSAMI, S.: *Zur Verträglichkeit von Implantaten am Beckenboden*. Doktorarbeit, Medizinische Fakultät der Ludwig - Maximilians - Universität München, 2010.
85. SCALES, J.T.: *Materials for hernia repair*. Proc. R. Soc. Med., 46:647–652, 1953.
86. SCHAUDIENST, C.B.: *Kosten- und Risikoanalyse des intraperitonealen Onlay-Mesh (IPOM) versus der Sublay-Technik in der Hernienchirurgie*. Doktorarbeit, Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universität Bonn, 2010.
87. SCHENEK, A.: *Lexikon Garne und Zwirne: Eigenschaften und Herstellung textiler Fäden*. Dt. Fachverlag, 2006.
88. SCHIEBLER, THEODOR H, FRIEDHELM SCHNEIDER, LUIZ C JUNQUEIRA und J CARNEIRO: *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; mit 20 Tabellen*. Springer, 2. Auflage, 1991.
89. SCHMIDT, PETER FRITZ, WILFRIED J BARTZ und ELMAR WIPPLER: *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*. Nummer 444. expert Verlag Renningen-Malsheim, 1994.
90. SCHOLZEN, THOMAS und JOHANNES GERDES: *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. Journal of Cellular Physiology, (182):311–322, 2000.
91. SCHREINER, LUCAS, THAIS GUIMARAES DOS SANTOS, ALESSANDRA BORBA ANTON DE SOUZA und CHRISTIANA CAMPANI NYGAARD: *Electrical stimula-*

- tion for urinary incontinence in women: a systematic review. *International braz j urol*, 39(4):454–464, 2013.
92. SCHULTE-FREI, B.: *Inkontinenzprävention im Alltag*. Gynäkologie und Geburtshilfe, 18(3):30–36, 2013.
93. SCHUMPELICK, V., U. KLINGE, K. JUNGE und M. STUMPF: *Incisional abdominal hernia: the open mesh repair*. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*, 389(1):1–5, 2004.
94. SCHUMPELICK, V., U. KLINGE, G. WELTY und B. KLOSTERHALFEN: *Mesher in der Bauchwand*. *Der Chirurg*, 70:876–887, 1999.
95. SHI, DONGLU: *Sheng wu cai liao yu zu zhi gong cheng = Biomaterials and tissue engineering*. Beijing: Qing hua da xue chu ban she., 2004.
96. STERNBERG, K, T LANGER, C HARDER, B HEUBLEIN und K-P SCHMITZ: *In vitro Charakterisierung der Wirkstofffreisetzung von Drug-Eluting Stents*. *Biomed. Technik*, 49:606–607, 2004.
97. STERNBERG, K, T LANGER, S KRAMER, E GRUNOW, T DIENER, B HEUBLEIN und K-P SCHMITZ: *In vitro Methoden zur Beurteilung von Polymerbeschichtungen mit Pharmakabeladung*. *Biomed. Technik*, 48:396–397, 2003.
98. SZEWCZYK, MARLEN: *Untersuchungen zum Einfluss von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze *Linum usitatissimum* auf die Zellproliferation und Zytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblastzellen und Fibroblasten*. Diplomarbeit, Universitätsfrauenklinik, Universitätsmedizin Rostock und Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock, 2007.

99. TAYLOR, CLIVE R. und GARY KLEDZIK: *Immunohistologic techniques in surgical pathology—A spectrum of “new” special stains*. Human Pathology, 12(7):590 – 596, 1981.
100. TECHNOLOGIES, CELLSIGNALING: *BrdU Cell Proliferation Assay Kit*, 2015.
101. THEIL, K.: *Untersuchungen zum Einfluss eines Linum usitatissimum-Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17beta-Estradiol*. Doktorarbeit, Universitätsfrauenklinik, Universitätsmedizin Rostock, Universität Rostock, 2011.
102. ULFIG, N.: *Kurzlehrbuch Histologie*. DeL. Thieme, 3 Auflage, 2011.
103. USHER, F.C.: *New Technique for Repairing Incisional Hernias with Marlex Mesh*. American Journal of Surgery, 138:740–741, 1979.
104. VESTWEBER, KH, F LEPIQUE, F HAAF, M HORATZ und A RINK: *Netzplastiken bei Bauchwand-Rezidivhernien-Ergebnisse [Mesh-plasty for recurrent abdominal wall hernias—results]*. Zentralblatt für Chirurgie, 122(10):885—888, 1997.
105. WEIDMANN, A.: *Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zum Wirkmechanismus des Ionenkanalantagonisten Mibefradil an humanen Linsenepithelzellen zur Entwicklung einer präventiven Therapiestrategie des Nachstars*. Doktorarbeit, Universitätsmedizin Rostock und Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock, 2009.

106. WEYERSTAHL, T. und M. STAUBER: *Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe*.
DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob. Stuttgart: Carl Thieme Verlag, 2001.
107. WIKIPEDIA.DE: *Polypropylen*.
108. WIKIPEDIA.DE: *Polyvinylidenfluorid*.
109. WINTERMANTEL, E. und S.W. HA: *Medizintechnik: Life science engineering*.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 5 Auflage, 2009.
110. WITZEL, O.: *Über den Verschluss von Bauchwunden und Bruchpforten durch versenkte Silberdrahtnetze (Einheilung von Filigranpelotten)*. Zentralblatt der Chirurgie, 10:257–260, 1900.
111. WOLF, BERNHARD, MARTIN BRISCHWEIN, WERNER BAUMANN, RALF EHRET und MICHAEL KRAUS: *Monitoring of cellular signalling and metabolism with modular sensor-technique: The PhysioControl-Microsystem (PCM®)*. Biosensors and Bioelectronics, 13(5):501 – 509, 1998.

Abbildungsverzeichnis

1.1	SERASIS PA-Band und das entsprechende Netzgewirk.	15
1.2	TiLOOP®, Fa. pfm	16
1.3	SERATOM® PP, Fa. SERAG-Wiessner & Co. KG, Naila, Deutschland	17
1.4	Anatomie des weiblichen Beckenbodens.	22
1.5	Transobturatorische Implantation alloplastischer Netze zur Therapie von Beckenbodendefekten. www.eesom.com	24
1.6	Schematische Darstellung von Zysto- und Rectozele. www.eesom.com .	25
3.1	Summenformel des PP ¹⁰⁷	31
3.2	Summenformel des PVDF ^{43;108}	32
3.3	Konservative und konfluente Fibroblasten als Monolayer; Skalierungs- balken = 250 µm.	41
3.4	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit einer Bürker-Zählkammer. ⁹⁸ . Farblos = vitale Zelle, Blaufärbung = letale Zelle.	42
3.5	Well-Zellkulturplatte mit Netzvarianten und Zellkultursuspension. . . .	44
3.6	Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstests ^{51;61;101}	52
3.7	Einzelne Arbeitsschritte des BrdU-Tests ^{40;100}	55

3.8	Prinzip des BrdU-Tests: Einbau von BrdU anstelle von Thymidin in die DNA ^{98;101}	55
3.9	Prinzip des MTT-Tests ^{98;101}	57
3.10	Arbeitsprinzip EDX-Verfahren ¹	65
3.11	Nahtmaterial steril in Zentrifugenröhrchen.	67
3.12	Sensorchip und Bionas 2500® analyzing system ¹¹¹	68
4.1	Metabolismus der Zelle: pH-Wertänderungen; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum reinen Medium und zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005) bezogen auf Medium + Fibroblasten.	72
4.2	Lichtmikroskopische Darstellung: Bruchstücke eines resorbierbaren Netzes nach 12wöchiger Inkubation; weißer Skalierungsbalken = 250 µm. .	73
4.3	Metabolismus der Zelle: Glukoseanalysen; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum reinen Medium und zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005).	74
4.4	Metabolismus der Zelle: Nachweis des oxid. Stresses; Fibroblasten + Netzmaterialien im Vergleich zum Medium + Fibroblasten; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005) bezogen auf Medium + Fibroblasten.	75

4.5	Immunhistochemische Charakterisierung von kommerziellen und primären Fibroblasten; Vimentin positiv (rotes Zytoplasma); Skalierungsbalken = 250 µm.	76
4.6	Prim. Fibroblasten; CD 68 neg. (blaue Kerne + blaues Zytoplasma) → nur Fibroblasten vorhanden; Skalierungsbalken = 250 µm.	76
4.7	Rezeptoranalyse an primären Fibroblasten; blaue Kerne und rotes Zytoplasma; weißer Skalierungsbalken = 250 µm	77
4.8	Primäre Fibroblasten p53+; blau-grüne Reaktion = HistoGreen, rote Reaktion = LinRed; weißer Skalierungsbalken = 250 µm.	78
4.9	Prim. Fibroblasten mit PA-Faden; Ki 67+. Positive Reaktion in den Zellen mit LinRed = rote Färbung; weißer Skalierungsbalken = 250 µm. . .	79
4.10	Beispielprotokoll einer FACS-Analyse.	80
4.11	FACS-Analysen; Einfluss von verschiedenen Netzmaterialien auf das Apoptoseverhalten adulter Fibroblasten; dargestellt wurden die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen.	80
4.12	Proliferation der Fibroblasten mit Netzkontakt im Vergleich zu Fibroblastenproliferation ohne Netzkontakt = 100 %; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005).	81
4.13	Prozentuale Darstellung der mitochondrialen Vitalität/Proliferation; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005).	82
4.14	Zytotoxizität [%] der Netze bestimmt mit dem LDH-Test; dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen (*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005).	83

- 4.15 Im Vergleich verschiedene nicht resorbierbare Netze (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG.; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil), 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm. 85
- 4.16 Im Vergleich verschiedene nicht resorbierbare SERAMESH-Netze mit unterschiedlicher Porengröße und Filamentstrukturen (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG.; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil), 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm. 86
- 4.17 Nicht resorbierbare PP-Netze (schwarzer Pfeil) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co.KG. im Vergleich zu dem PP-Netz Gynemesh der Fa. Ethicon; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm. 87
- 4.18 Im Vergleich standen nicht resorbierbare PP-Netze (schwarzer Pfeil) und beschichtete Materialien (PP+PP/Ti) der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und der Fa. pfm; adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm. 88
- 4.19 Im Vergleich standen nicht resorbierbare, unbeschichtete PP- Netze zu einem nicht resorbierbaren silberbeschichteten PP-Netz der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG (schwarzer Pfeil); adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm. 90

4.20	Ergebnisse von teilresorbierbaren PP-Netze der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon (schwarzer Pfeil); adulte Fibroblastenzellkultur (roter Pfeil); 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm.	91
4.21	Vergleichen der Ergebnisse von einem nicht resorbierbaren PP- Netz (Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG und Fa. Ethicon) mit einem nicht resorbierbaren PVDF-Netz (Fa. Dahlhausen); Netzmaschen = schwarze Pfeile; adulte Fibroblastenzellkultur = roter Pfeil; 12 Wochen Inkubationszeitraum; weißer Skalierungsbalken Lichtmikroskopie = 250 µm, REM = 200 µm.	92
4.22	EDX-Analyse des nicht resorbierbaren Netzes SERAMESH (100 % PP); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff). .	93
4.23	EDX-Analyse des nicht resorbierbaren Netzes DYNAMESH SIS (100 % PVDF); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, F: Fluor, Al: Aluminium).	94
4.24	EDX-Analyse des nicht resorbierbaren/beschichteten Netzes SERAMESH Ag (PP +Ag); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, Ag: Silber, Ca: Kalzium, Si: Silizium).	95
4.25	EDX-Analyse des nicht resorbierbaren/beschichteten Netzes SERATOM Ti (PP +Ti); Peak steht für jeweiliges Element (O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, Ti: Titan, Si: Silizium, Ca: Kalzium).	96
4.26	Graphische Auswertung der Zelladhärenz mit ImageJ.	98
4.27	Schmelzkurve für die Quantifizierung der Zelladhärenz am iCycler. . .	99
4.28	Graphische Darstellung der Zelladhärenz durch molekularbiologische Arbeitstechnik.	100

4.29	Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Atmung ¹¹¹ .	104
4.30	Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Adhäsion ¹¹¹	105
4.31	Ergebnisse vom Bionas 2500® analyzing system; Parameter: Ansäuerung; ¹¹¹	106
4.32	Entwicklung der Zelladhärenz am TiLOOP® (pfm medical ag). Dargestellt ist der Bewuchs einzelner Netzfäden mit Fibroblasten über einen Zeitraum von 60 h (siehe rote Pfeile und Einkastungen).	107
4.33	Explantat SERASIS PP (schwarzer Pfeil); Narbenplatte (roter Pfeil); weißer Skalierungsbalken = 250 µm.	109
4.34	Explantat TiMESH (schwarzer Pfeil); Narbenplatte (roter Pfeil); weißer Skalierungsbalken = 250 µm.	110

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Netzmuster	33
3.2	Ansatz für LDH-Bestimmung (ELISA, Fa. Roche) ⁹⁸	53
3.3	Ansatz für BrdU-Bestimmung (ELISA, Fa. Roche) ⁹⁸	56
3.4	Ansatz für MTT-Test ELISA, Fa. Roche) ⁹⁸	57
3.5	Pipettierschema des RT-Mastermix + RNA; Gesamtvolumen/Ansatz = 22 µl.	61
3.6	Inkubationszeiten für RT-Reaktion.	61
3.7	Pipettierschema für einen standardisierten PCR-Reaktionsansatz.	62
3.8	Temperatur- und Zeitvorgaben im Thermocycler; Σ 40 Zyklen.	63
4.1	Elementgehalt [%] vom Netz SERAMESH; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff.	93
4.2	Elementgehalt [%] vom Netz DYNAMESH SIS; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff, F: Fluor, Na: Natrium, Al: Aluminium.	94
4.3	Elementgehalt [%] von dem Netz SERAMESH Ag; C: Kohlenstoff, O: Sauerstoff, Ag: Silber, Ca: Kalzium, Si: Silizium.	95
4.4	Elementgehalt [%] vom Netz SERATOM Ti; C: Kohlenstoff, O: Sauer- stoff, Ti: Titan, Ca: Kalzium, Si: Silizium.	96
4.5	Auflistung der prozentualen Zelladhärenz mit ImageJ.	98

4.6	Marginalie zur graphischen Darstellung der Zelladhärenz auf der Ebene der Molekularbiologie; (Abbildung 4.28).	100
5.1	Eigenschaften von heutigen Netzen	114
5.2	Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	151

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt. Hiermit möchte ich allen herzlich für ihre Unterstützung danken. Besonders möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Prof. Volker Briesse für die Betreuung und Gutachtertätigkeit.

Herrn Prof. Christoph Alexiou aus Erlangen für das große Interesse, den regen Meinungsaustausch und die Gutachtertätigkeit.

Herrn Prof. Udo Jeschke aus München für die Hilfe, Ermutigungen, netten Gespräche und Gutachtertätigkeit.

Dem Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik, das mich immer unterstützt hat. Besonders möchte ich mich bei Frau MTLA Erika Greschkowitz und Frau Dipl.-biol. Marlen Szewczyk bedanken für die Mühe des Korrekturlesens.

Frau Prof. Barbara Nebe und ihren Mitarbeitern für die durchflusszytometrischen Messungen.

Herrn Dipl. Ing. Labs und Herrn Dipl. Ing. Fulda aus dem EMZ Rostock für die Rasterelektronenmikroskopie.

Danksagung

Herrn Dipl. Ing. (FH) Oliver Gramalla von der Fa. SERAG WIESSNER GmbH & Co. KG, für die Bereitstellung der Biomaterialien und für die ständige Hilfe jeglicher Art.

Herrn Chefarzt Dr. med. Achim Niesel danke ich für die Unterstützung von Seiten des Fachbereichs Urogynäkologie und für sein Interesse an der Arbeit.

Herrn Dr. Jörg Neymeyer aus der Charité (Berlin -Steglitz) danke ich für die Bereitstellung der Explantate.

Bei den Mitarbeitern der Fa. Bionas GmbH für die pharmakodynamischen Analysen.

Bei meiner Freundin, Frau MTLA Irmi Wiest-Alexiou, die immer für mich da war. Ich danke ihr für die Geduld, fürs Zuhören und für das Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner Tochter Claudia für ihre enorme Unterstützung, Zusammenhalt, den regen Meinungsaustausch und den festen Glauben daran, dass meine Arbeit ein Erfolg wird.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Habilitation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den

Dr. Dagmar-Ulrike Richter

APPENDIX

- Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien
- Daten-CD mit Adhärenzvideo (Abbildung 4.32) und PDF-Datei der Habilitation

Tabelle 5.2: Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Glass Distortion Target (25 x 25mm, 0.125mm Spacing)	Edmund Optics GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Laborgeräte	
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Digitale Mikroskop Kamera PC 1049	Canon Inc., Japan
ELISA-Multiwell-Reader	BioRad GmbH, Deutschland
Kühlschrank KTP 1730	Liebherr Premium, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Zeiss®, Deutschland
Lichtmikroskop AxioStar plus	Zeiss®, Deutschland
Sterilbank	Heraeus GmbH, Deutschland
Tiefkühlgerät (-188°C) K-Series	Cryostorage Systems, Deutschland
Kühltruhe (-80°C)	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge	Hettich, Deutschland
Bionas 2500® analyzing system	Bionas GmbH, Deutschland
Spectrometer	Pharmacia Biotech, Deutschland
Vortexgerät Typ REAX 2000	Roth, Deutschland
iCycler	BioRad GmbH, Deutschland
Chemikalien	
Ethanol 70 %	Fa. Roth, Deutschland
Formafix 4,0 %, gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH, Deutschland

Fortsetzung Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), steril	Roth, Deutschland
UHU-Kleber®-Hart	UHU GmbH Co. KG, Bühl, Deutschland
Desinfektionsmittel Bacillol R plus	Bode GmbH, Deutschland
HCl	Roth GmbH, Deutschland
H ₂ SO ₄	Roth GmbH, Deutschland
Zellkultur	
Amphotericin B, 250 µl/ml, steril	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Kryo-SFM (Einfriermedium)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Fibroblast Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Supplement Mix Fibroblast Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen
Penicillin/Streptomycin Lösung (100x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Pipetten, Pipettenspitzen, verschied. Größen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,05 %/ 0,02 % in DPBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Deutschland

Fortsetzung Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Zählkammer nach Bürker	Fein-Optik, Jena, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Biochrom AG, Deutschland
Zellkultur-Testplatten, 12/24/96 Well/flach	Biochrom AG, Deutschland
Zellkulturflaschen 25, 75 u. 150 cm ² , steril	Biochrom AG, Deutschland
DetachKit-250	PromoCell GmbH, Deutschland
Trypanblau (0,4%ig)	Sigma-Aldrich-Chemie, Deutschland
Fibronektin	PromoCell, Deutschland
Sensorchips	Bionas GmbH, Deutschland
Immunhistochemie	
ImmPRESS™ Universal Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
R.T.U Normal Horse blocking serum 2,5 %	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
ImmPRESS™ Universal Reagent	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Anti Mouse/Rabbit Ig Peroxidase	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
LinRed-Lösung	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland

Fortsetzung Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
p53 monoklonaler Antikörper (Histopri-me®)	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen, Deutschland
MIB-1 monoklonaler Antikörper (Ki 67)	DAKO Denmark A/S, Glostrup
Vimentin (MAK)	DAKO Denmark A/S, Glostrup
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
ER α (MAK)	DAKO Deutschland
CD 68 (MAK)	DAKO, Deutschland
Progesteron (MAK)	DAKO, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Roth GmbH, Deutschland
Zytotoxizitätstest mit Lactatdehydrogenase	
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Triton-X (1 %)	Roth GmbH, Deutschland
Proliferationstest BrdU	
Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Vitalitätstest MTT	
Cell Proliferation ELISA MTT (colorimetric)	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland

Fortsetzung Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Messung des oxydativen Stress	
Hydrogen Peroxide Assay Kit	BioVision Research Products, Mountain View, USA
Rasterelektronenmikroskopie und EDX-Analyse	
EDX-Detektor	KEVEX
Ethanol o. Aceton 30, 50, 75, 90 u. 100 %	Roth GmbH, Deutschland
Glutaraldehyd (2,5 %)	Roth GmbH, Deutschland
Kontrastierungsautomat Ultrastainer	Leica Deutschland
Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,2)	Biochrom AG, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop DSM 960 A	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Stahlflasche CO ₂ 4,5 mit Steigrohr	Linde
Trocken-Anlage (critical point dryer) K 850	EMITECH
Wärmeschrank Typ SM 400	Memmert GmbH & Co., Schwabach, Deutschland
Vortexgerät Typ REAX 2000	Roth GmbH, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
FACS-Analyse	
Facs-Röhrchen	BD Biosciences, Belgien

Fortsetzung Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Durchflusscytometer BD FACSCalibur mit Argon-Laser	BD Biosciences, Belgien
Quantifizierung des Zellwachstums	
RNeasy Mini Kit®	Qiagen, Deutschland
β -Actin F und β -ActinR	Invitrogen, Deutschland
DEPC-Aqua dest.	Roth GmbH, Deutschland
342bp (oligo dT cDNA) Fragmente	Biozol GmbH, Deutschland